



## Tesis Doctoral

# Identificación de genes candidatos involucrados en la progresión y la patogénesis del cáncer de mama.

Laura Paula Saucedo Cuevas

Madrid, 2013

DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR

FACULTAD DE CIENCIAS

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID



## Identificación de genes candidatos involucrados en la progresión y la patogénesis del cáncer de mama.

Tesis doctoral que presenta para optar al título de Doctor por la Universidad  
Autónoma de Madrid la Licenciada en Biología

**Laura Paula Saucedo Cuevas**

Co-directores de tesis

**Dr. Javier Benítez Ortiz**

**Dra. María José García Pérez**



Grupo de Genética Humana

Programa de Genética del Cáncer Humano

Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas (CNIO)

Esta tesis doctoral ha sido realizada en el Grupo de Genética Humana del Programa de Genética del Cáncer Humano del Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas (CNIO) bajo la supervisión del Dr. Javier Benítez Ortiz y la Dra. María José García Pérez.

Las siguientes ayudas han permitido la realización de la presente tesis doctoral:

- Ayuda Predoctoral de Formación en Investigación en Salud (PFIS) con número de expediente FI08/00155

Identificación de genes  
candidatos involucrados en la  
progresión y la patogénesis  
del cáncer de mama.

# Índice



## **ABREVIATURAS, 1**

## **ABSTRACT, 3**

## **INTRODUCCIÓN, 7**

1. CÁNCER DE MAMA, 9
  - 1.1 LA GLÁNDULA MAMARIA, 9
  - 1.2 QUÉ ES EL CÁNCER DE MAMA, 10
  - 1.3 EPIDEMIOLOGÍA, 10
  - 1.4 CÁNCER DE MAMA FAMILIAR, 12
  - 1.5 CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DEL CÁNCER DE MAMA, 14
  - 1.6 MODELOS USADOS EN EL ESTUDIO DEL CÁNCER DE MAMA, 15
2. ARRAYS DE CGH Y AMPLIFICACIONES GENÓMICAS, 17
  - 2.1 GEN O GENES DIANA DE LA AMPLIFICACIÓN, 19
  - 2.2 REGIONES DE AMPLIFICACIÓN Y CÁNCER DE MAMA, 20
  - 2.3 ANÁLISIS Y DEFINICIÓN DE LA AMPLIFICACIÓN 13q34 EN EL CÁNCER DE MAMA FAMILIAR Y ESPORÁDICO, 21

## **OBJETIVOS, 23**

## **MATERIAL, 27**

1. TUMORES DE MAMA, 9
  - 1.1 CORRELACIÓN ENTRE LA PRESENCIA DE LA AMPLIFICACIÓN EN 13q34 Y LOS NIVELES DE mRNA DE LOS GENES LOCALIZADOS EN LA REGIÓN MÍNIMA AMPLIFICADA, 30
  - 1.2 CORRELACIÓN ENTRE LA PRESENCIA DE LA AMPLIFICACIÓN EN 13q34 Y LOS NIVELES DE EXPRESIÓN PROTEICA DE LOS GENES CANDIDATOS TFDP1 Y CUL4A, 30

- 1.3 CARACTERIZACIÓN INMUNOHISTIPATOLÓGICA DE LOS TUMORES QUE PRESENTAN AMPLIFICACIÓN EN 13q34 Y/O SOBREENPRESIÓN DE LOS GENES TFDPI Y CUL4A, 30
2. LÍNEAS CELULARES DE MAMA TUMORAL Y NO TUMORAL, 30
3. RATONES INMUNODEPRIMIDOS, 31

## **MÉTODOS, 33**

- 1.
2. AISLAMIENTO DE RNA Y SINTESIS DE cDNA, 35
  - 1.1 EXTRACCIÓN DE RNA DE TEJIDO EMBEBIDO EN PARAFINA, 35
  - 1.2 EXTRACCIÓN DE RNA DE LÍNEAS CELULARES, 35
  - 1.3 SÍNTESIS DE CDNA, 36
2. PCR CUANTITATIVA TIEMPO REAL, 36
3. CONSTRUCCIÓN DE MATRICES DE TEJIDO (TMAs), 38
4. INMUNOHISTOQUÍMICA, 38
  - 4.1 TUMORES HUMANOS, 38
  - 4.2 TUMORES Y ÓRGANOS DERIVADOS DE MODELOS MURINOS, 41
5. CULTIVO CELULAR, 41
6. EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS E INMUNODETECCIÓN POR WESTERN BLOT, 42
7. CREACIÓN DE LÍNEAS CELULARES ESTABLES MEDIANTE TRANSDUCCIÓN LENTIVIRAL, 44
  - 7.1 VECTORES LENTIVIRALES, 44
  - 7.2 PLÁSMIDOS DE EMPAQUETAMIENTO Y PLÁSMIDO DE LA ENVUELTA, 46
  - 7.3 CLONACIÓN DEL CDNA DE CUL4A EN EL VECTOR FG12, 47
  - 7.4 PRODUCCIÓN DE SOBRENADANTES LENTIVIRALES, 49
  - 7.5 INFECCIONES LENTIVIRALES, 50
  - 7.6 SELECCIÓN DE CÉLULAS TRANSDUCIDAS DE FORMA ESTABLE, 50
8. EXPERIMENTOS IN VITRO, 51
  - 8.1 PROLIFERACIÓN CELULAR, 51
  - 8.2 APOPTOSIS, 52
  - 8.3 CICLO CELULAR Y CUANTIFICACIÓN DE LA FASE S, 52
  - 8.4 ENSAYOS DE FORMACIÓN DE COLONIAS, 53
  - 8.6 ENSAYO DE COOPERACIÓN ONCOGÉNICA, 54
  - 8.7 ENSAYO DE ESTABILIDAD DE PROTEÍNAS, 55



- 9. EXPERIMENTOS IN VIVO, 55
- 10. CAMBIOS GLOBALES EN LA EXPRESIÓN PROTEICA: iTRAQ, 57
- 11. CAMBIOS GLOBALES EN LA EXPRESIÓN GÉNICA: ARRAYS DE EXPRESIÓN, 60
- 12. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS, 61

## **RESULTADOS, 63**

- 1. CARACTERIZACIÓN DEL AMPLICÓN 13q34: SELECCIÓN DE GENES CANDIDATOS, 65
  - 1.1 CORRELACIÓN ENTRE LA PRESENCIA DEL LA AMPLIFICACIÓN 13q34 Y LOS NIVELES DE mRNA DE LOS GENES LOCALIZADOS EN LA REGIÓN MÍNIMA AMPLIFICADA, 65
  - 1.2 CORRELACIÓN ENTRE LA PRESENCIA DEL LA AMPLIFICACIÓN 13q34 Y LOS NIVELES DE EXPRESIÓN PROTEICA DE LOS GENES CANDIDATOS CUL4A Y TFDP1, 69
  - 1.3 ASOCIACIÓN DE LA AMPLIFICACIÓN 13q34 Y/O SOBREEXPRESIÓN DE LOS GENES CANDIDATOS CUL4A Y TFDP1 CON DIFERENTES MARCADORES INMUNOHISTOQUÍMICOS, 71
  - 1.4 JUSTIFICACIÓN DE LA ELECCIÓN DE CUL4A PARA SU CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL, 74
- 2. DEFINICIÓN DEL PAPEL ONCOGÉNICO DEL GEN CANDIDATO CUL4A, 75
  - 2.1 SELECCIÓN DE MODELOS CELULARES, 75
  - 2.2 EXPERIMENTOS IN VITRO, 79
  - 2.3 EXPERIMENTOS IN VIVO, 102
  - 2.4 MECANISMO MOLECULAR DEL EFECTO ONCOGÉNICO DE CUL4A: POSIBLES MOLÉCULAS Y/O RUTAS MOLECULARES MEDIADORAS, 107

## **DISCUSIÓN, 119**

- 1. CUL4A Y TFDP1 PODRÍAN SER DIANA DE LA REGIÓN DE AMPLIFICACIÓN 13q34 EN CÁNCER DE MAMA, 121
- 2. LA MODULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE CUL4A MODIFICA LA VIABILIDAD CELULAR IN VITRO E IN VIVO, 126

3. CUL4A REGULARÍA LA VIABILIDAD Y PROLIFERACIÓN DE LAS CÉLULAS MAMARIAS A TRAVÉS DE LA DEGRADACIÓN DE P21, P27 Y P53, 131
4. LA METALOTIONEÍNA MT2A PODRÍA SER UNA NUEVA MOLÉCULA MEDIADORA DEL PAPEL ONCOGENÉTICO DE CUL4A EN CÁNCER DE MAMA, 133

## **CONCLUSIONES, 139**

## **BIBLIOGRAFÍA, 143**

# Abreviaturas

**ADN** Ácido desoxirribonucleico

**ARN** Ácido ribonucleico

**ATCC** *American Type Culture Collection*

**aCGH** Hibridación Genómica Comparativa en soporte de *array*

**BrdU** *bromodesoxiuridina*

**cCGH** Hibridación Genómica Comparativa convencional

**cDNA** ADN copia

**CNIO** Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas

**DAPI** *4',6-diamidino-2-phenylindole*

**FISH** Hibridación *In Situ* con Fluorescencia

**HA** Hemaglutinina

**IHQ** Inmunohistoquímica

**MCS** *multi cloning site*,

**MTT** *3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide*

**miRNA** microRNA

**mRNA** RNA mensajero

**Mb** Megabase

**ORF** *open reading frame*

**PCR** *Polymerase chain reaction*

**RT-qPCR** *Reverse Transcriptase-quantitative Polymerase Chain Reaction*

**RNAi** RNA interferente

**siRNA** *small interfering RNA*

**shRNA** *short hairpin RNA*

**TMA** Micromatriz de tejido

**WB** *Western Blott*



# Abstract



Breast cancer is a complex and heterogeneous disease and one of the most frequent causes of cancer-related deaths in developed countries. DNA copy number alterations occur frequently in breast tumours. Regions of DNA amplification are of major interest since often contain oncogenes whose increased expression confers tumour cells a selective advantage and contributes to the carcinogenesis process. In our laboratory prior analysis of familial and sporadic breast tumours by using array-based Comparative Genomic Hybridization (aCGH) resulted in the identification of an amplification event at the 13q34 region with an overall frequency of 4.5% that increased to 8.1% in BRCA1-associated tumours and to 20% in basal-like tumours. A minimal common region of amplification that spanned 1.8Mb and contained 26 genes was defined.

With this antecedents and by using quantitative Real-Time PCR and immunohistochemistry we identified that, among the genes in the region, *CUL4A* and *TFDP1* presented significant gene and protein overexpression when amplified, which supports their role as likely driver oncogenes within the 13q34 amplification.

We next focused our efforts on elucidating the possible implication of the *CUL4A* E3 ubiquitin ligase in the initiation and/or progression of breast cancer. By lentiviral infection we induced the stable up-regulation of *CUL4A* in human the 184B5 immortalized non-transformed mammary epithelial cells. We also stably silenced *CUL4A* in MDA-MB-157 and HCC1937, two basal-like breast cancer cell lines that amplify and/or overexpress *CUL4A*, the latter derived from the tumour of a *BRCA1*-mutation carrier. With these modified cell lines we performed *in vitro* functional assays that comprised cell viability experiments, S-phase BrdU incorporation assessment, anchorage-dependent and independent colony formation analysis or apoptosis evaluation. We eventually tested *in vivo* *CUL4A*-related changes in the tumorigenicity of our cell line models using xenografts in nude mice.

We observed that *CUL4A* overexpression in the 184B5 cell line increased cell viability and proliferation rate in association with a higher percentage of cells entering in the S-phase, which included a population of cycling polyploid cells; also cells showed enhanced anchorage-dependent and independent colony formation ability. We found evidences for cooperation between *CUL4A* and *H-Ras-V12*. Despite these *in vitro* transforming-related features, overexpression of *CUL4A* was not enough to generate 184B5-derived tumours in xenografted mice. Conversely, *CUL4A*-silencing in the *CUL4A*-overexpressing MDA-MB-157 and HCC1937 breast cancer cell lines resulted in diminished

cell viability and proliferation accompanied by a decrease of cells entering the S-phase of cell cycle. Also, *CUL4A*-silencing induced a decreased in the colony-forming ability of tumoural cells. In addition, decreased expression of *CUL4A* resulted in lower growth rate of tumours generated by both cells lines when xenografted in nude mice.

In order investigate the mechanisms by which *CUL4A* induces the observed phenotypes we analyzed some proteins known to be targeted for proteosomal degradation by *CUL4A* such as p21, p27 and p53. Following protein synthesis inhibition using cycloheximide we did not observed modifications in the degradation rate of p21 and p27 when overexpressing *CUL4A*; however, p53 levels were lower in the 184B5 cells that exogenously expressed *CUL4A* than in control cells. In contrast, *CUL4A* silencing in the HCC1937 cells did produce a reduced degradation rate and accumulation of p21 and p27 cyclin-dependent kinase inhibitors. Reduction and accumulation of these proteins involved in blocking cell cycle progression, might explain the increased and decreased cell viability and proliferation associated to the overexpression and inhibition of *CUL4A*, respectively. We also aimed to defined novel *CUL4A* mediators and by using a proteomic approach we performed differential protein expression profiling in our cell line models. Using this strategy we identified the Metallothionein-2 (MT2A), which is highly expressed in primary breast tumours, as a novel putative modulator of the *CUL4A* oncogenic role in breast cancer.

In summary, our results support the role of *CUL4A* as a driver oncogene at the 13q34 amplification. Our evidences suggest a role of *CUL4A* in modulating breast cancer aggressiveness and progression rather than a major involvement in the initial steps of the oncogenic process. We demonstrated that in breast cancer, as described for other tumour types, p21, p27 and/or p53 would mediate *CUL4A* oncogenic effect and in addition we defined novel candidate proteins that might help to further elucidate *CUL4A* oncogenic properties.



# Introducción

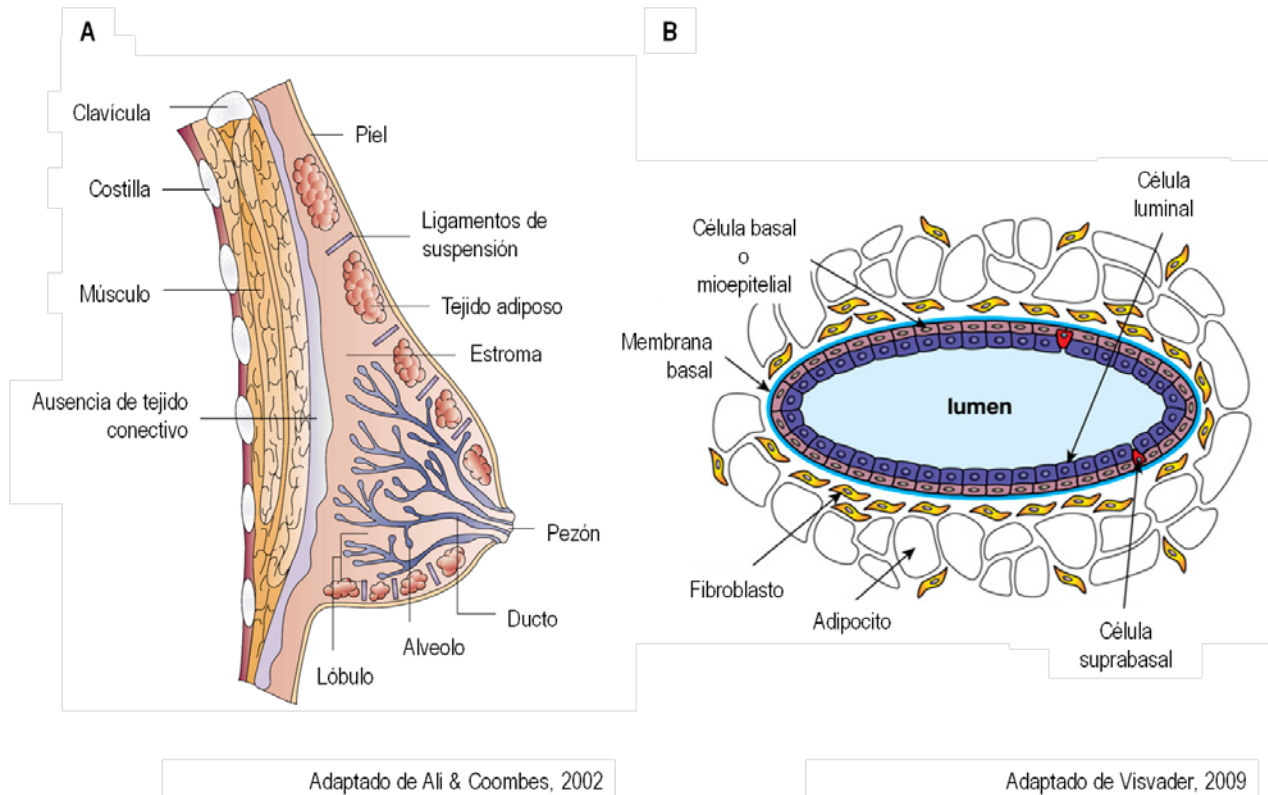


# 1. CÁNCER DE MAMA

## 1.1. LA GLÁNDULA MAMARIA

La glándula mamaria es un órgano secretor complejo que comprende un sistema de ductos rudimentarios sumidos en paquetes de grasa (Figura 1A). La glándula está integrada por diferentes tipos celulares: células epiteliales que forman la red de ductos de la mama; adipocitos, que forman la almohadilla de grasa mamaria en la que se embebe la red de ductos; células endoteliales vasculares que constituyen los vasos sanguíneos; células del estroma, incluyendo los fibroblastos; y diversas células inmunes (Figura 1B) (Watson and Khaled, 2008).

Existen dos tipos de epitelio en la glándula mamaria: luminal y basal. El epitelio luminal forma los ductos, alveolos y lóbulos (conjunto de alveolos) secretores, mientras que el epitelio basal se integra esencialmente por células mioepiteliales. Estos dos tipos de epitelio forman una estructura de bicapa epitelial simple que se embebe en el estroma graso (Figura 1B) (Watson and Khaled, 2008)).



**Figura 1. Estructura del tejido mamario normal.** (A) Anatomía de la glándula mamaria humana. Cada glándula mamaria contiene 15-20 lóbulos, cada lóbulo presenta series de ductos ramificados que drenan al pezón. (B) Cada ducto está delineado por una capa de células epiteliales (luminales), responsables de la producción de leche. Estas están rodeadas por otra capa de células epiteliales (basales o mioepiteliales) con propiedades contráctiles. Los ductos glandulares se encuentran embebidos en el estroma fibroblástico (Ali and Coombes, 2002; Visvader, 2009).

Hay tres etapas principales en el desarrollo de la glándula mamaria: embrionaria, pubescente y adulta. Las hormonas y los factores de crecimiento juegan un papel importante en las diferentes etapas del desarrollo de la glándula mamaria y también están implicados en cáncer de mama (Watson and Khaled, 2008).

## 1.2. QUÉ ES EL CÁNCER DE MAMA

El cáncer de mama es una enfermedad compleja y heterogénea originada a partir de una proliferación anormal y desorganizada de las células que componen el tejido mamario. El cáncer de mama se clasifica de acuerdo al componente celular principalmente afectado. La implicación de las células de los lóbulos en la enfermedad da lugar al carcinoma lobular o lobulillar. Por otro lado, cuando en el proceso tumoral se ven involucradas las células de los ductos se denomina carcinoma ductal. Además, los carcinomas que se limitan al lóbulo o conducto se designan "carcinomas in situ", mientras que los que se desarrollan a partir de los conductos o lóbulos y rompen la membrana basal invadiendo la parte no funcional de la mama (tejido adiposo, conectivo, vasos y nervios), se denominan "carcinomas invasivos o infiltrantes".

## 1.3. EPIDEMIOLOGÍA

El cáncer de mama es el cáncer más frecuente entre las mujeres. Se estiman que en 2008 se diagnosticaron 1.38 millones de nuevos casos en mujeres de todo el mundo, lo que supone aproximadamente un cuarto (23%) de todos los cánceres diagnosticados en mujeres (Ferlay *et al.*, 2010). La incidencia de cáncer de mama se ha incrementado en la mayoría de los países del mundo en las últimas décadas, denotando un rápido aumento en los países desarrollados (Figura 2) (Ferlay

*et al.*, 2010). Los índices de incidencia del cáncer de mama en mujeres varían hasta cinco veces entre las diferentes regiones del mundo. En 2008, las incidencias variaron de entre 20 casos por cada 100.000 habitantes en África Oriental y Meridional a 90 por cada 100.000 en Europa Occidental (Figura 3) (Ferlay *et al.*, 2010). Dentro de Europa los países con los mayores índices de incidencia en 2008 fueron Bélgica y Dinamarca (109 y 101 Afectados por cada 100.000 habitantes, respectivamente). En España se diagnostican unos 22.000 nuevos casos al año siendo esta incidencia de las más bajas entre los países europeos (Ferlay *et al.*, 2010). Se piensa que aspectos como el comportamiento reproductivo y el uso de hormonas exógenas y factores como el peso, el ejercicio, la dieta y el consumo de alcohol marcan las diferencias entre las regiones desarrolladas y en desarrollo (Allen *et al.*, 2009; Beral, 2003; Ferlay *et al.*, 2010; Monninkhof *et al.*, 2007; Reeves *et al.*, 2007). Se estima que los índices de cáncer de mama podrían reducirse hasta la mitad en los países desarrollados si las mujeres tuviesen más hijos y los amamantasen durante más tiempo (Cancer, 2002).

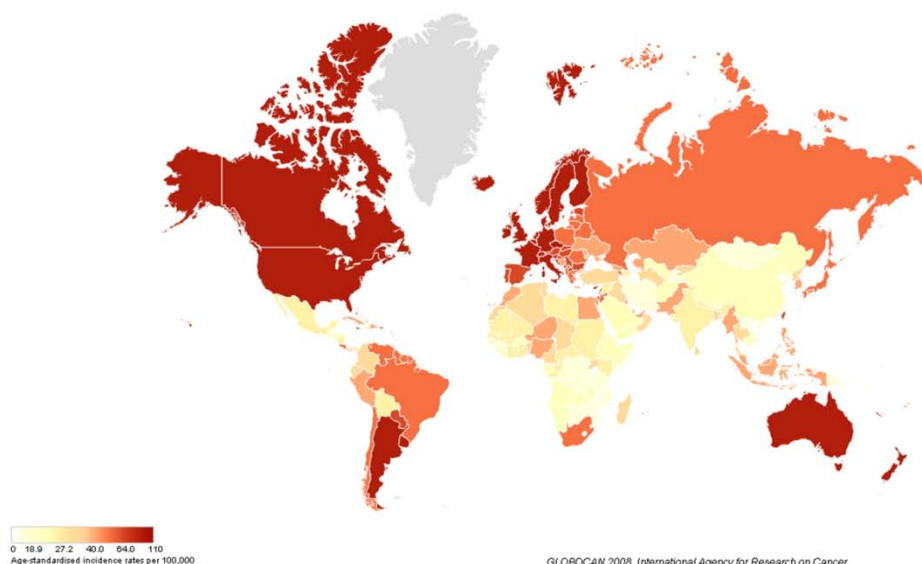


Figura 2. Incidencia del cáncer de mama en el mundo en 2008.

Respecto a la mortalidad, el cáncer de mama es la causa de muerte más frecuente en mujeres de todo el mundo, estimándose que es la responsable de al menos 460.000 muertes en 2008 (Ferlay *et al.*, 2010). Existe variación en la mortalidad causada por cáncer de mama entre los diferentes países del globo, principalmente debido a una mayor supervivencia en los países desarrollados (que

por otro lado son los que mayor incidencia de la enfermedad presentan), con rangos que varía de los 6 casos por cada 100.000 habitantes en el oriente de Asia a los 19 por cada 100.000 en el sur y oeste de África en 2008 (Figura 3). Dentro de los países de la Unión Europea, Irlanda presentaría la mayor tasa de mortalidad por cáncer de mama (31.1 muertes por cada 100.000 mujeres) mientras que España, en consonancia con los datos de incidencia, también presentaría la tasa más baja de mortalidad (18.4 muertes por cada 100.000 mujeres) (estimaciones de 2008) (Cabanés *et al.*, 2010; Ferlay *et al.*, 2010).

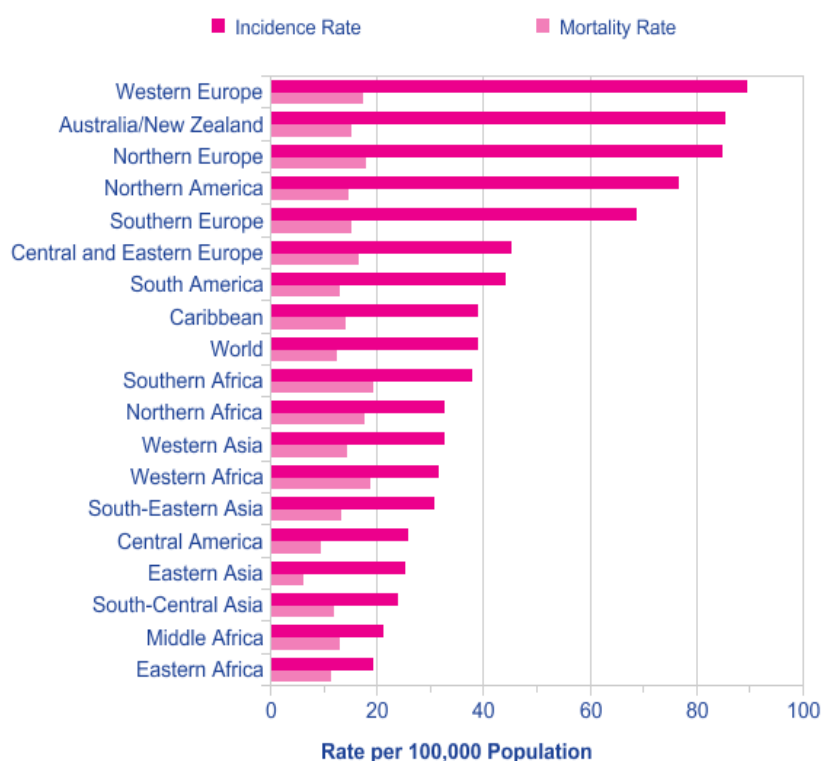


Figura 3. Estimaciones en las tasas de incidencia y mortalidad en cáncer de mama estandarizadas por edad en las regiones del mundo en 2008.

#### 1.4. CÁNCER DE MAMA FAMILIAR

La mayor parte de los casos de cáncer de mama afectan a la población de forma esporádica aunque existe un pequeño porcentaje, en torno al 5%, que se denomina de tipo familiar y que se caracteriza, a grandes rasgos, por la presencia de más de un miembro de la familia afectado por

cáncer de mama, una edad temprana de aparición, mayor frecuencia de casos bilaterales, y la aparición de otros tipos de tumores en la familia (ovario, colon, próstata, de endometrio o sarcomas).

Su origen se atribuye a la herencia de mutaciones en genes de susceptibilidad al cáncer de mama. Los dos genes de alta susceptibilidad al cáncer de mama identificados hasta la fecha son *BRCA1* (Miki *et al.*, 1994) y *BRCA2* (Wooster *et al.*, 1995) que explicarían aproximadamente un 20% del cáncer familiar. El descubrimiento de estos dos genes ha permitido extender durante los últimos años el conocimiento sobre la epidemiología genética del cáncer de mama, el riesgo exacto a padecer la enfermedad, la distribución por etnias, el asesoramiento genético y las consecuencias clínicas de sus mutaciones. Además de *BRCA1* y *BRCA2* se han identificado otros genes de alta susceptibilidad relacionados con cánceres hereditarios asociados a síndromes. Éstos incluyen las mutaciones germinales en *TP53* encontradas en cánceres asociados al síndrome de Li-Fraumeni (Garber *et al.*, 1991; Malkin, 1994), mutaciones germinales en *PTEN* en el síndrome de Cowden (Nelen *et al.*, 1996), y mutaciones en *STK11/LKB1* en el síndrome de Peutz-Jegher (Hemminki *et al.*, 1998).

Existe otro grupo de genes que confieren un riesgo moderado a padecer cáncer de mama, entre los que se encuentran *CHEK2* (Meijers-Heijboer *et al.*, 2002), *PALB2* (Rahman *et al.*, 2007), *BRIP1* (Seal *et al.*, 2006) o *ATM* (Renwick *et al.*, 2006). Este conjunto de genes explicarían alrededor de un 5% adicional del cáncer de mama hereditario.

Finalmente existen variantes frecuentes en la población que individualmente confieren bajo riesgo y que se han descrito principalmente a través de los denominados GWAS (*Genome Wide Association Studies*). Hasta hace unos meses se conocían 27 alelos de este tipo de pero en abril de este año se han descrito 41 adicionales; globalmente estas variantes frecuentes de baja penetrancia explicarían hasta un 14% del riesgo familiar (Michailidou *et al.*, 2013).

## 1.5. CARACTERIZACIÓN CLÍNICO/MOLECULAR DEL CÁNCER DE MAMA

Desde un punto de vista clínico e histopatológico, esta enfermedad heterogénea, se clasifica en tres grupos terapéuticos básicos. El grupo de tumores que se caracteriza por ser positivos para la expresión del receptor de estrógenos (RE) es el más numeroso y diverso. Por otro lado, se encuentra el grupo de tumores que presentan amplificación del receptor del factor de crecimiento epidérmico humano tipo 2 o *HER2* (también denominados *ERBB2*) (Slamon *et al.*, 1987) cuya caracterización constituyó un gran éxito clínico debido a la efectividad de la terapia dirigida a la amplificación y sobreexpresión de *HER2*. Esta estrategia sirvió de precedente en posteriores caracterizaciones de otras aberraciones en el número de copias de ADN en cáncer de mama (Bergamaschi *et al.*, 2006; Chin *et al.*, 2006). Por últimos, los tumores de mama triple negativos se caracterizan por perder la expresión del RE, la del receptor de la progesterona (RP) y carecer de amplificación y sobreexpresión de *HER2*. De esta manera se define un tipo de tumores que tan solo tienen la opción de tratarse con quimioterapia y que, además, tienen una gran incidencia en portadores de mutaciones germinales en *BRCA1* (Foulkes *et al.*, 2003; Sorlie *et al.*, 2003).

En los últimos años se han desarrollado tecnologías que permiten el análisis molecular de los tumores a nivel de genoma completo, facilitando su caracterización desde diferentes puntos de vista y con cada vez mayores niveles de resolución. Entre estas tecnologías se encuentran aquellas que analizan las aberraciones en el número de copias de DNA, las que perfilan el patrón global de expresión génica o las focalizadas en el estudio de la expresión de microRNAs (miRNA). Hasta el momento la mayor parte de estos análisis se han realizado usando los denominados "*microarrays*" o micromatrices aunque más recientemente están ya siendo abordados mediante la secuenciación masiva (Pleasance *et al.*, 2010).

Brevemente, la Hibridación Genómica Comparativa realizada con *microarrays* (aCGH) es un método de citogenética molecular que permite el análisis de las variaciones en el número de copias de DNA (ganancias/pérdidas) a un nivel muy alto de resolución (Skena *et al.*, 1995). El DNA a estudiar se hibrida sobre un cristal en el que están impresos de cientos a miles de clones que representan desde regiones concretas del genoma a la totalidad de éste. En los *microarrays* de expresión, lo que está impreso en el cristal es DNA copia, es decir, un RNA mensajero que se



retrotranscribe produciendo la secuencia de DNA de un gen solo con sus exones, de esta manera se pueden analizar las variaciones en los niveles de expresión de un amplio conjunto de genes. Por otro lado, los microRNAs se han convertido en unas moléculas atractivas para caracterizar el cáncer de mama. Estos RNAs pequeños no codificantes de unos 19-25 nucleótidos suponen una alternativa que contribuye a distinguir entre subtipos histológicos, clasificar tumores indiferenciados o predecir el pronóstico de los pacientes (Nymark *et al.*, 2011).

La clasificación molecular de los tumores de mama mejor establecida y con mayor repercusión traslacional hasta la fecha es la derivada de su patrón de expresión génica (mediante el uso de *arrays* de expresión). El primer estudio de los tumores de mama a través de *arrays* de expresión efectuado por Perou y colaboradores reveló la estratificación molecular de los tumores de mama en cinco subtipos reproducibles con diferentes características biológicas, resultados clínicos y respuesta a quimioterapia (Perou *et al.*, 2000). Tres de los grupos fueron negativos para la expresión del receptor de estrógenos (RE): tumores *Basal-like*, caracterizados por la expresión de citoqueratina-5 y citoqueratina-17; tumores *ErbB2* que sobreexpresaron ERBB2 (HER2) y genes relacionados; y los tumores *Normal breast-like* que expresaban genes de células adiposas y no adiposas. Por otro lado, otros dos grupos de tumores fueron positivos para la expresión del RE: tumores *Luminal A*, con altos niveles de expresión de citoqueratina-8 y citoqueratina-18; y, *Luminal B* con un diferente nivel de expresión del RE y una tasa de proliferación más elevada (Perou *et al.*, 2000; Sorlie *et al.*, 2001; Sorlie *et al.*, 2003). Los subgrupos moleculares se han ampliado incluyendo actualmente un sexto subgrupo denominado *Claudin-low* que se caracteriza por la baja expresión de los genes *tight junction* (Perou, 2011).

## 1.6. MODELOS USADOS EN EL ESTUDIO DEL CÁNCER DE MAMA

Puesto que el cáncer de mama es un conjunto heterogéneo de afecciones con diversas histopatologías, variaciones genéticas y genómicas que manifiestan diferentes resultados clínicos el principal desafío en el avance del conocimiento de la biología del cáncer de mama es la disponibilidad de modelos experimentales que recapitulen los diversos aspectos de la enfermedad. Debido a esta complejidad y heterogeneidad no es esperable que un único modelo represente todos

las variables de la enfermedad (Vargo-Gogola and Rosen, 2007). Los modelos experimentales que se suelen utilizar para analizar los procesos involucrados en la iniciación y progresión del cáncer de mama incluyen las líneas celulares de mama normal y tumoral, los *xenografts* o xenotransplantes y los ratones modificados genéticamente (GEM) (Vargo-Gogola and Rosen, 2007).

Las líneas celulares de mama normal y tumoral han sido el modelo más ampliamente usado para investigar cómo se desregulan la proliferación, la apoptosis y la migración en el desarrollo del cáncer de mama. El uso de líneas celulares proporciona gran cantidad de información sobre genes y rutas de señalización que regulan estos procesos. Además, las líneas celulares se pueden crecer en forma de *xenograft* un procedimiento que consiste en la implantación de células de una especie en otra distinta, de manera que células humanas pueden injertarse en ratón. Esta técnica permite evaluar el efecto que las alteraciones génicas o la inhibición y/o activación de distintas rutas moleculares tienen en la capacidad tumorógena de las células, no sólo en experimentos *in vitro* sino también *in vivo*, incluyendo las complejas interacciones entre las células del tumor y del estroma que intervienen en formación y la progresión del tumor (Vargo-Gogola and Rosen, 2007).

Los *xenografts* frecuentemente se generan mediante la inyección subcutánea de las células tumorales en el flanco del ratón pero este microambiente puede perturbar el crecimiento y la metástasis potencial de las células implantadas. Una variación de esta metodología es el trasplante ortotópico de las células en el interior de la glándula mamaria del ratón. Como se ha dicho, la glándula mamaria humana se caracteriza por presentar una red ramificada de ductos que finaliza en racimos de pequeños alveolos que constituyen los lóbulos (Figura 2A), surgiendo en esta estructura la gran mayoría de los cánceres de mama. Por el contrario, el entramado de la mama en ratones no posee alveolos y lóbulos, sino que consta de unas pequeñas evaginaciones al final de los ductos en la glándula mamaria que se desarrollan durante la pubertad (Figura 2B) (Visvader, 2009). Además, la glándula mamaria de ratón posee menos tejido fibroso conectivo que la mama humana, pero considerablemente más adipocitos (Visvader, 2009). A pesar de las diferencias en la arquitectura de las ramificaciones de los ductos entre ambas especies así como entre el estroma de la mama del ratón y la humana, existen evidencias que revelan notables paralelismos en sus estructuras celulares y lo que es más importante se favorece la existencia de un microambiente más favorable para las células injertadas.

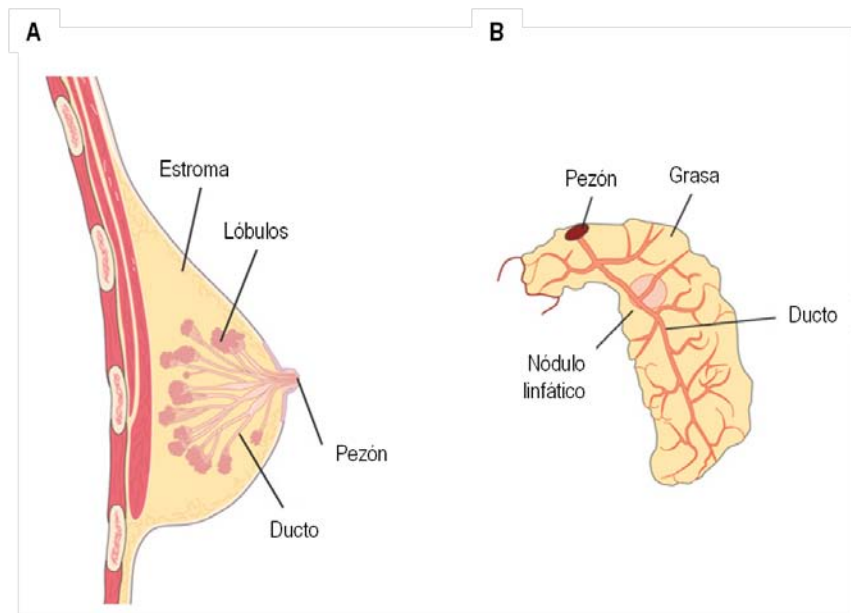


Figura 2. Comparación esquemática de las glándulas mamarias de humano (A) y de ratón (B).

## 2. ARRAYS DE CGH Y AMPLIFICACIONES GENÓMICAS

Se ha mencionado anteriormente que entre las tecnologías utilizadas para la caracterización molecular del cáncer de mama se encuentran los *arrays* de CGH. El análisis de las alteraciones en el número de copias de DNA que tienen lugar en el genoma de las células tumorales ha aportado información de gran utilidad. Este tipo de aproximación experimental ayuda a la definición de nuevos genes supresores de tumores ya que la delección del material cromosómico que los contiene es uno de los mecanismos que conducen a la pérdida de su función. De esta forma la localización de regiones de pérdida ayudaría a la localización de posibles genes supresores. Asimismo esta tecnología contribuye a la identificación de oncogenes ya que regiones de ganancia de material cromosómico alojan potencialmente este tipo de genes promotores de la tumorigénesis, que se sobreexpresarían como consecuencia de la amplificación de la región que los contiene (Albertson,

2006; Natrajan *et al.*, 2010; Turner *et al.*, 2010a). Otras vías de activación de oncogenes serían las mutaciones puntuales, los reordenamientos cromosómicos y los mecanismos epigenéticos.

Históricamente se ha creído que cada amplicón podría albergar un solo gen diana (*driver gene*), es decir, un gen cuya sobreexpresión, favorecida por su amplificación, pudiera conferir una ventaja adaptativa a aquellas células que exhibiesen dicha amplificación. Sin embargo, estudios recientes demuestran que los amplicones pueden contener más de un gen diana (Bernard-Pierrot *et al.*, 2008; Holland *et al.*, 2011; Kao and Pollack, 2006; Natrajan *et al.*, 2012; Turner *et al.*, 2010b). Este sería el caso de la amplificación de la región genómica 11q13-q14, aberración genómica muy frecuente en tumores sólidos, incluyendo mama, ovario, pulmón, piel (melanoma) esófago, páncreas, vejiga, y cabeza y cuello (Carneiro *et al.*, 2008; Gansauge *et al.*, 1997; Gollin, 2001; Kwek *et al.*, 2009; Schraml *et al.*, 2003). De los genes localizados en esta amplificación, inicialmente se propuso el gen *CCND1* como diana de la misma. No obstante, estudios posteriores sugieren que otros genes localizados en la región 11q13-q14, *CTTN*, *EMSY*, *PAK1* y *GAB2*, que también podrían conferir una ventaja a las células tumorales (Balasenthil *et al.*, 2004; Bentires-Alj *et al.*, 2006; Bocanegra *et al.*, 2010; Chunder *et al.*, 2004; Dedes *et al.*, 2010; Elsheikh *et al.*, 2008; Hui *et al.*, 1997; Jirstrom *et al.*, 2005; Kwek *et al.*, 2009; Lundgren *et al.*, 2008; Mottolese *et al.*, 2007; Reis-Filho *et al.*, 2006; Roy *et al.*, 2010). También en este sentido, aunque está ampliamente establecido que *ERBB2* (también llamado *HER2*) es el gen diana del amplicón 17q12, se ha sugerido que existen otros genes dentro de la región mínima de amplificación, como son *STARD3* y *GRB7*, que se requerirían para la proliferación o la supervivencia de células cancerígenas con la amplificación (Kao and Pollack, 2006). Asimismo, en el amplicón 19q12 se requiere para la supervivencia de las células que muestran la amplificación de esta región no solo la expresión de *CCNE1* sino también la de de *POP4*, *PLEKHF1* y *TSZH3* (Natrajan *et al.*, 2012). En cualquier caso hay que tener en cuenta que no todos los genes incluidos en un amplicón conferirían una ventaja a las células cancerígenas que lo contienen y, que en principio, sólo un gen o una selección de genes del amplicón serían requeridos para la supervivencia de las células que lo presentan.

Por otra parte el aumento de resolución en las técnicas usadas para caracterizar regiones de amplificación, también denominadas amplicones, ha puesto de manifiesto su elevada complejidad. Se ha determinado que en algunos casos en lugar de tener el amplicón una pequeña y única región de amplificación está compuesta por distintos núcleos o regiones independientes recurrentemente

amplificadas en cáncer. Asimismo, la llegada de la secuenciación masiva ha desvelado que la estructura de los amplicones podría ser incluso más compleja de lo que se asumía previamente (Campbell *et al.*, 2008; Lee *et al.*, 2010; Stephens *et al.*, 2009).

## 2.1. GEN O GENES DIANA DE LA AMPLIFICACIÓN

La definición de gen diana de una amplificación está íntimamente ligada a la idea de la adquisición de una ventaja adaptativa por parte de la célula cancerígena que lo amplifica. Por lo tanto, los métodos que tan solo evalúan el número de copias de una región cromosómica no proporcionan una evidencia directa de que un gen es la diana de una amplificación ya que es necesario determinar que la amplificación génica correlaciona significativamente con su sobreexpresión. No obstante es importante reseñar que no todos los genes que se sobreexpresan de manera consistente cuando están amplificados constituyen un gen diana, ya que pueden ser meros “pasajeros” de la amplificación y no ser requeridos para la supervivencia de las células tumorales (Wilkerson and Reis-Filho, 2012).

La caracterización funcional es, por lo tanto, crucial para determinar si un gen es realmente diana en un amplicón dado (Brough *et al.*, 2011; Stephens *et al.*, 2012). Con frecuencia la naturaleza de un gen a ser diana dentro de un amplicón se demuestra documentando las ventajas que supone, tras forzar su sobreexpresión en células que carecen de su amplificación, en crecimiento, proliferación, invasión, migración, o habilidades metastáticas (Grillo *et al.*, 2006). Estudios de este tipo son difíciles de interpretar debido a que estos genes podrían ser diana de una manera dependiente de contexto o ser fuertemente dependientes de interacciones epistáticas (Brough *et al.*, 2011). Por lo tanto, es esencial demostrar que la expresión de potenciales drivers se requiere para adquirir o mejorar las características celulares arriba mencionadas en diferentes contextos. De hecho, un aparente gen diana de amplificación debe acentuar cualquiera de los aspectos del fenotipo maligno de una célula tumoral (Hanahan and Weinberg, 2011), cada uno de los cuales podría ser dependiente de contexto y ejercer el efecto señalado de manera independiente al resto, por ejemplo, la amplificación de un gen podría conferir un aumento de la migración o la invasión a

las células cancerígenas, pero no manifestar efecto alguno en proliferación o en la evasión de la apoptosis.

La aparición de la tecnología de RNA interferente (RNAi) ha sido fundamental en la caracterización de genes diana de las amplificaciones. El RNAi es un proceso natural a través del cual la expresión de un gen concreto se puede bloquear con alta especificidad y selectividad. Los métodos para mediar el efecto del RNAi incluyen *small interfering* RNA (siRNA) y *short hairpin* RNA (shRNA). La identificación de genes dianas a través de este tipo de análisis se basa en constatar la pérdida de características transformadas de células tumorales al silenciar el gen candidato. El uso de la tecnología de iRNA sobre hipótesis generadas por los resultados del estudio del perfil de número de copias y/o datos de expresión génica han identificado *FGFR1*, *PPAPDC1B* y *ZNF703* como posibles genes diana del amplicón 8p11.2-p12 (Bernard-Pierrot *et al.*, 2008; Holland *et al.*, 2011; Turner *et al.*, 2010b), *FGFR2* como diana del amplicón 10q26 (Turner *et al.*, 2010a) y *PPM1D* del amplicón 17q23.2 (Natrajan *et al.*, 2009).

Colectivamente, estudios de esta naturaleza han generado listas de genes contenidos en amplicones que se requieren de manera selectiva para la supervivencia de las células que muestran su amplificación.

## 2.2. REGIONES DE AMPLIFICACIÓN Y CÁNCER DE MAMA

La definición de los amplicones más recurrentes y la búsqueda de otros genes distintos a los conocidos que pudieran favorecer el desarrollo del cáncer de mama ha sido objeto de diferentes estudios. Al igual que en otros subtipos tumorales, el interés que suscita el estudio de las regiones de amplificación en el cáncer de mama, radica en el posible valor pronóstico que presentaría el tener o no un determinado amplicón y, a su vez, la posible aplicación de terapias específicos (como el trastuzumab ante la amplificación de *ERBB2*) que conducirían a mejores respuestas al tratamiento. Asimismo si determinadas amplificaciones aparecen con especial frecuencia en subtipos tumorales concretos pueden ser utilizadas como marcadores y ser una herramienta diagnóstica.

Entre las amplificaciones más frecuentes descritas en cáncer de mama algunas han sido objeto de múltiples estudios en los que se ha identificado el gen diana de su amplificación. Este sería el caso de la amplificación 17q12 cuyo gen diana es ERBB2, 11q13-q14 donde CCND1 dirige la amplificación y 8q24 cuya diana es MYC (12,13). Y más recientemente, se ha identificado a ZNF703 como el gen diana de la amplificación en 8p12 (Garcia *et al.*, 2005; Gelsi-Boyer *et al.*, 2005; Holland *et al.*, 2011; Sircoulomb *et al.*, 2011). Sin embargo, otras amplificaciones son aún no están bien definidas y se proponen varios genes como diana de la amplificación, como por ejemplo en 10q26 y 19p13 (Turner *et al.*, 2010a).

En lo que respecta al cáncer de mama familiar, hay cierto desconocimiento de la frecuencia, localización e importancia de los amplicones. Durante estos últimos años, nuestro grupo de Genética Humana ha intentado resolver estas cuestiones y por ejemplo ha confirmado la presencia de la amplificación 8p11-p12 en el 11% de los casos de cáncer de mama familiar (Melchor *et al.*, 2005; Melchor *et al.*, 2007a; Melchor *et al.*, 2007b; Melchor *et al.*, 2007c). Otras de las amplificaciones cuya caracterización en cáncer de mama ha abordado nuestro grupo es la localizada en la región cromosómica 13q34 (Melchor *et al.*, 2007b; Melchor *et al.*, 2009).

### **2.3. ANÁLISIS Y DEFINICIÓN DE LA AMPLIFICACIÓN 13q34 EN EL CÁNCER DE MAMA FAMILIAR Y ESPORÁDICO**

La amplificación 13q34 se trata de un evento genómico descrito con una baja frecuencia en carcinomas de células escamosas (Shinomiya *et al.*, 1999), carcinoma adrenocortical (Dohna *et al.*, 2000), o hepatocarcinomas (Yasui *et al.*, 2002), entre otros. En lo que respecta al cáncer de mama, solo dos trabajos se han centrado en su caracterización. El primero de ellos fue publicado en 1998 y analizó la frecuencia de amplificación y sobreexpresión de un gen candidato localizado en 13q34, *CUL4A* (Chen *et al.*, 1998). En un segundo estudio, más reciente, los autores describen la amplificación y sobreexpresión de un conjunto de genes en tumores de mama de modelos murinos, localizados en una región homóloga a la región cromosómica humana 13q34. Tras el análisis de la frecuencia de amplificación en carcinomas de mama humanos y la incorporación de datos públicos

de expresión génica y clínicos, sugirieron *CUL4A*, *LAMP1*, *TFDP1* y *GAS6* como los genes diana de la sobreexpresión y amplificación de esta región en el cáncer de mama (Abba *et al.*, 2007).

En estudios previos en nuestro grupo mediante estudios de cCGH (Hibridación Genómica Comparativa convencional) y aCGH se encontró que la región 13q34 estaba amplificada en el 4.5% de los tumores de mama familiares y tumores de mama esporádicos estudiados (Melchor *et al.*, 2009). Además, se encontró que esta aberración genómica se asocia principalmente a tumores RE-negativos y basales y que la frecuencia de la amplificación aumentaba en los tumores *BRCA1* (8 %) (Melchor *et al.*, 2009). Aunque se vio que presentaba una frecuencia inferior a otras amplificaciones más estudiadas (8p11-p12, 8q24 o 17q12-q21) debido a su especial recurrencia en tumores basales y la ausencia de una previa caracterización de la región decidimos centrar nuestros esfuerzos en la misma.

Un análisis detallado de la región 13q34 nos ha llevado a acotar la región mínima de amplificación a 1,8 Mb. Esta región engloba un total de 26 genes (incluyendo genes hipotéticos de función desconocida) (Melchor *et al.*, 2009), algunos de los cuales coincidirían con los propuestos como candidatos en algunos de los estudios previos, entre ellos el gen *CUL4A*.



# Objetivos



Los objetivos diseñados para el presente estudio son los siguientes:

1. Caracterización del amplicón 13q34 y selección de los genes candidatos diana de esta amplificación.
2. Definición del papel oncogénico del gen candidato *CUL4A* mediante ensayos funcionales *in vitro* e *in vivo*. Para ello en modelos celulares previamente seleccionados:
  - 2.1 Se determinará el efecto producido por la sobreexpresión estable del gen
    - a. Se establecerán los efectos derivados de la inactivación estable del gen
3. Identificación de dianas moleculares de *CUL4A*.



# Material



## 1. Tumores de mama

En el desarrollo del presente trabajo se utilizó material parafinado procedente tanto de tumores de mama de tipo familiar como esporádico. Los tumores familiares correspondían a pacientes con cáncer de mama pertenecientes a familias de alto riesgo genético. Según criterios previamente establecidos estas familias se seleccionaron por (i) presentar al menos tres miembros con cáncer de mama y/o ovario en la misma rama familiar; (ii) al menos dos miembros con cáncer de mama siendo familiares de primer grado y con edad de diagnóstico en al menos uno de ellos inferior a los 50 años de edad; (iii) al menos un caso de cáncer de mama y otro de ovario o de cáncer de mama bilateral en la misma rama familiar; (iv) al menos un miembro afectado con cáncer de mama y ovario o con cáncer de ovario bilateral; o (v) al menos un varón con cáncer de mama. En todos los pacientes familiares se estudiaron las mutaciones y grandes reordenaciones genómicas en los genes BRCA mediante procedimientos estándar (Diez et al., 2003; Osorio et al., 2000).

Las muestras de cáncer de mama familiar procedieron de tres centros españoles: Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas (CNIO) y Fundación Jiménez Díaz en Madrid y Hospital Santa Creu i Sant Pau en Barcelona. Las muestras de cáncer de mama esporádico se obtuvieron a través del Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas (CNIO), el Centro de Cáncer de Solca (Ecuador) y la Universidad de Pensilvania (USA).

En todos los tumores utilizados se conocía el número de copias de la región 13q34 ya que este había sido definido en trabajos anteriores del grupo mediante Hibridación Genómica Comparativa convencional (cCGH) o usando matrices de clones o *arrays* (aCGH) así como mediante Hibridación *In Situ* con Fluorescencia (FISH) (Melchor et al., 2008).

A continuación se detallan las series de tejidos tumorales fijados y embebidos en parafina empleados en los diferentes los estudios.

### 1.1. Correlación entre la presencia de amplificación en 13q34 y los niveles de mRNA de los genes localizados en la región mínima amplificada

El nivel de expresión de 11 genes seleccionados dentro de la región mínima de amplificación se evaluó en 6 tumores de mama que presentaron amplificación en 13q34 así como en 13 tumores de mama que no exhibían cambios en el número de copias en esta región. Los 6 tumores con

amplificación correspondían a 5 tumores familiares (3 tumores *BRCA1*, 1 tumor *BRCA2* y 1 tumor *BRCAX*) y 1 tumor esporádico.

### **1.2. Correlación entre la presencia de amplificación en 13q34 y los niveles de expresión proteica de los genes candidatos *TFDP1* y *CUL4A***

El estudio de asociación entre la presencia de amplificación y los niveles de expresión proteica de los genes candidatos *TFDP1* y *CUL4A* se llevó a cabo mediante tinción inmunohistoquímica en 156 tumores de mama familiares y 258 tumores de mama esporádicos distribuidos en 2 y 3 micromatrices de tejido (TMAs), respectivamente.

### **1.3. Caracterización inmunohistopatológica de los tumores que presentan amplificación en 13q34 y/o sobreexpresan los genes *TFDP1* y *CUL4A***

El mismo conjunto de tumores especificado en el apartado anterior fue utilizado para determinar posibles asociaciones entre las características inmunohistopatológicas de los tumores y la existencia de amplificación en 13q34 y/o presencia de sobreexpresión de los genes candidatos *TFDP1* y *CUL4A*.

## **2. Líneas celulares de mama tumoral y no tumoral**

La definición del papel oncogénico de los genes candidatos se llevó a cabo en modelos de líneas celulares. Con el objeto de establecer los modelos celulares idóneos en los que desarrollar los estudios funcionales se preseleccionó un panel de líneas celulares de mama en los que se caracterizó la expresión de los genes candidatos. En la tabla adjunta se detallan las características y procedencia de las líneas seleccionadas.

El panel incluyó la línea celular de cáncer de mama MDA-MB-157 que según trabajos previos del grupo presenta amplificación en la región 13q34 (Melchor et al., 2008) así como otras líneas celulares descritas en la literatura o en bases de datos de aCGH como portadoras de amplificación o



ganancia en la región de interés. Además se incluyeron otras líneas celulares de cáncer de mama sin alteración genómica en esta región así como líneas inmortalizadas pero no transformadas establecidas a partir de tejido mamario normal.

Tabla 1. Panel de líneas celulares de mama

Línea celular	Subtipo <sup>(1)</sup>	ER <sup>(2)</sup>	PR <sup>(3)</sup>	ERBB2/HER2 <sup>(4)</sup>	Procedencia <sup>(5)</sup>	Nº copias 13q34 <sup>(6)</sup>
HCC1937 <sup>(11)</sup>	Basal	-	-	-	CPD	2
MDA-MB-436 <sup>(11)</sup>	Basal	-	-	-	AC	ND
UACC3199 <sup>(11)</sup>	ND	ND	ND	ND	ND	ND
MDA-MB-157 <sup>(12)</sup>	Basal	-	-	-	CM	5
HCC1187 <sup>(7)(12)</sup>	Basal	-	-	-	CPD	4
MFM-223 <sup>(8)(12)</sup>	ND	+	+	-	CPD	4
HCC1143 <sup>(7)(12)</sup>	Basal	-	-	-	CPD	3
SK-BR-3 <sup>(12)</sup>	Luminal	-	-	SE	AC	3
COLO824 <sup>(9)</sup>	ND	ND	ND	ND	CG	ND
Hs578T	Basal	-	-	-	AC	ND
MCF7	Luminal	+	+	-	AC	ND
MDA-MB-231	Basal	-	-	-	AC	ND
T47D	Luminal	+	+	-	CD	ND
184B5 <sup>(10)(13)</sup>	ND	ND	ND	ND	MN	ND
HBL-100 <sup>(9)(13)</sup>	Basal	-	-	-	MN	ND
MCF10A <sup>(13)</sup>	Basal	-	-	-	MN	ND

<sup>(1)</sup>Subtipo de cáncer de mama del que proceden las líneas celulares. ND: datos no disponibles. <sup>(2)</sup>Receptor de Estrógeno, ausencia (-) o presencia (+) de expresión. <sup>(3)</sup>Receptor de Progesterona, ausencia (-) o presencia (+) de expresión. <sup>(4)</sup>Receptor de crecimiento epidérmico 2. (-): No sobreexpresión de HER2. SE: sobreexpresión. <sup>(5)</sup>Tipo de tumor de mama del que se estableció la línea celular. AC: adenocarcinoma, CG: carcinoma glandular, CM: carcinoma medular, CPD: carcinoma primario ductal, CD: carcinoma ductal, MN: mama normal, ND: datos no disponibles. <sup>(6)</sup>Número de copias de la región 13q34 presente en la línea celular. Información extraída de <http://www.sanger.ac.uk/> y de estudios previos del grupo. <sup>(1)</sup>, <sup>(2)</sup>, <sup>(3)</sup> y <sup>(4)</sup> Información obtenida de Neve *et al.*, 2006. <sup>(5)</sup> Información extraída de las fichas técnicas de las líneas celulares disponibles en <http://www.atcc.org/> y <http://www.dsmz.de/>. Líneas celulares cedidas amablemente por los laboratorios de Paul Edwards <sup>(7)</sup> y Manel Esteller <sup>(9)</sup>. Líneas procedentes del DSMZ (Braunschweig, Germany) <sup>(8)</sup> y de la ATCC (Manassas, VA, USA) <sup>(10)</sup>. El resto de líneas celulares estaban disponibles en nuestro laboratorio. <sup>(11)</sup> Líneas celulares de tipo familiar con inactivación de BRCA1. <sup>(12)</sup> Líneas celulares con más de dos copias de la región 13q34. <sup>(13)</sup> Líneas celulares inmortalizadas pero no transformadas

### 3. Ratones inmunodeprimidos

En los ensayos de tumorigenicidad se emplearon ratones Hsd:Athymic Nude-Foxn1<sup>nu</sup> hembra de 6 semanas de edad que se compraron a Harlan (Harlan Sprague Dawley, Inc., Indianapolis, IN). Estos ratones se caracterizan por presentar una mutación autosómica recesiva en el locus *nu* del cromosoma 11, aplasia del timo y pérdida de pelo. Su deficiencia en células T hace que sean un modelo excelente para la inoculación de células tumorales humanas sin que se produzca el rechazo de las mismas.



# Métodos



## 1. Aislamiento de RNA y síntesis de cDNA

### 1.1 Extracción de RNA de tejido embebido en parafina

Para llevar a cabo la extracción de RNA de los tumores incluidos en parafina en primer lugar se procedió a su desparafinación. Para ello las muestras se emplazaron durante una hora a 65°C y se trataron con xilol durante 10 minutos. Seguidamente los tejidos se incubaron en un buffer de digestión (10mM TrisHCl pH 8.0; 0.1mM EDTA; 2%SDS y 500µg/ml proteinasa K). La purificación del RNA siguió un procedimiento estándar mediante tratamiento con solventes orgánicos (fenol-cloroformo-álcohol isoamílico, 25:24:1) y posterior precipitación de los ácidos nucleicos de la fase acuosa con isopropanol, glicógeno y acetato de sodio. Una vez resuspendido el pellet en agua libre de RNAsas se procedió a tratar la solución con DNasa (Ambion Inc., Austin, TX) durante 30 minutos a 37°C. Transcurrido este tiempo, la enzima fue inactivada mediante incorporación de un agente inactivante facilitado por el fabricante.

### 1.2 Extracción de RNA de líneas celulares

Para la extracción de RNA total de las líneas celulares se procedió a la siembra de las células en placas de 100 mm de diámetro y a la recogida de las mismas al alcanzarse un 70% de confluencia. Se siguieron dos procedimientos para la recogida y lisis celular:

- En la caracterización de la expresión de los genes candidatos en el panel de líneas celulares, las células se levantaron mediante tripsina. Los pellets celulares se lavaron en una solución salina fosfatada al 1X (PBS) y se lisaron con TRIzol (Invitrogen, Carlsbad, CA).
- En el estudio de los cambios globales en la expresión génica mediante arrays de expresión, las células se lavaron con PBS y se trataron directamente en la placa con TRIzol (Invitrogen, Carlsbad, CA). Con la ayuda de un raspador se levantaron y lisaron.

Partiendo de las lisis celulares conservadas en TRIzol (Invitrogen, Carlsbad, CA), se realizó la extracción de RNA total de acuerdo con las indicaciones del fabricante. Posteriormente se realizó un proceso de purificación con el Kit comercial *RNase Mini Kit* (Qiagen, Hilden, Germany) que incluye un tratamiento con DNasa I en columna. La cantidad y la calidad del RNA extraído se valoró

mediante el kit RNA 6000 Nano Assay en el Bioanalyzer Agilent 2100 (Agilent Technologies, Palo Alto, CA).

### 1.3 Síntesis de cDNA

Para la síntesis de cDNA se siguieron dos procedimientos en función del material biológico del que se partió en la extracción del RNA.

En el caso de los tumores, debido a la degradación de los ácidos nucleídos como consecuencia del procesamiento llevado a cabo para su inclusión en parafina, no se cuantificó la cantidad del RNA total extraído. Se usaron 25  $\mu$ l de esta extracción para la reacción de retrotranscripción. En el caso de las líneas celulares se utilizó 1  $\mu$ g de RNA total.

En ambos casos, para la síntesis de cDNA se usó la enzima retrotranscriptasa M-MLV (Invitrogen, Carlsbad, CA) y hexámeros degenerados (Invitrogen, Carlsbad, CA). Se siguieron las condiciones de reacción estándar especificadas para dicha enzima así como el volumen final establecido por el fabricante. El volumen final se incrementó en el caso de la retrotranscripción del RNA total procedente de parafina pero manteniendo las proporciones recomendadas.

El cDNA resultante se conservó a -20°C. En el caso del procedente de las líneas celulares previamente se diluyó 1/10 con agua libre de RNAsa (Accugene, VWR, Radnor, PA).

## 2. PCR cuantitativa a tiempo real

Para el diseño de los ensayos de PCR cuantitativa a tiempo real (qRT-PCR) se utilizó la página web de la librería de sondas universales de la casa comercial Roche Applied Science (Roche Diagnostics, Basel, Switzerland, <http://www.roche-applied-science.com>), donde se seleccionaron las sondas y cebadores más adecuados para la amplificación tanto para los genes candidatos como para el gen endógeno utilizado para la normalización entre muestras.

Las reacciones de qRT-PCR se llevaron a cabo por triplicado utilizando el equipo ABI Prism 7900HT de Applied Biosystems (Life Technologies, Carlsbad, CA). El volumen total de reacción fue de 10  $\mu$ l e incluyó 2  $\mu$ l del producto de la retrotranscripción (cDNA total en el caso de los tumores parafinados y cDNA diluido 1/10 en el caso de las líneas celulares), 5  $\mu$ l de 2X Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems, Life Technologies, Carlsbad, CA), 500 nM de cada uno de los

cebadores (*directo y reverso*) y 100 nM de la sonda de Roche Applied Science Universal Probe Library (Roche Applied Science, Indianapolis, IN).

Las amplificaciones se llevaron a cabo en placas de 384 pocillos mediante 40 ciclos consistentes en 15 segundos a 95 °C y un minuto a 60°C. En la reacción de amplificación se incluyeron los adecuados controles negativos (RNA no retrotranscrito de cada una de las muestras para detectar la posible amplificación a partir de DNA contaminante de la extracción y mezcla de reacción sin cDNA molde) y positivo (cDNA obtenido a partir de RNA comercial en la misma RT que las muestras).

La expresión relativa de los genes candidatos y del gen endógeno se determinó utilizando el software de acceso libre qBase (Hellesmans et al., 2007) que se basa en una modificación del método clásico del delta-delta Ct que permite incorporar las eficiencias específicas de las reacciones de PCR tanto de los genes de interés como del gen endógeno. En la Tabla 1 adjunta se especifican los cebadores y las sondas utilizados para cada uno de los genes evaluados.

Tabla 1. Cebadores y sondas universales usadas para el estudio de PCR cuantitativa a tiempo real

Nombre del gen	Cebadores	Sondas Universales #
<i>ARHGEF7</i>	FW: caacatccgcgagttcct RV: ctgggaaggaggaacagg	#81: ccagggcc
<i>ATP11A</i>	FW: tgggtctacagctgttgagg RV: agggcctcgatggtgtct	#2: caggagaa
<i>MCF2L</i>	FW: gctggagcagtcacagagc RV: ggcttaggggctctgttttc	#11: gctggaag
<i>CUL4A</i>	FW: ggaaagcacagtggcgaa RV: gggacacctggaattccttc	#59: cagtggca
<i>LAMP1</i>	FW: acctgggtgactctggagctg RV: accggctagaactgcattc	#15: tcctgctc
<i>G RTP1</i>	FW: agctacctggtcacgctcac RV: cggacatagcgcttcactg	#66: ggctgctg
<i>DCUN1D2</i>	FW: ggaacgctgtggacaagaa RV: tttgttttcatctgtggatctt	#78: agctggag
<i>TFDP1</i>	FW: cacgtctaacggcacaagg RV: ctgagaccattggagcttg	#53: ctctgcca
<i>GAS6</i>	FW: atggcatgtggcagacaat RV: ccctgttgacctgatgacc	#17: aggagctg
<i>RASA3</i>	FW: ggagctccagctcctacg RV: ggctctgtctaccattgtcc	#19: ctccagcc
<i>CDC16</i>	FW: cagcagcacagctgatgaa RV: agggctctccgggtgcaat	#41: ctccagcc
<i>BACT*</i>	FW: ccaaccgcgagaagatga RV: ccagaggcgtacaggatag	#64: ccaggctg

#Número identificador de Roche para cada una de las sondas; \* gen endógeno

### 3. Construcción de matrices de tejido (TMAs)

Para la elaboración de los TMAs utilizados en el presente trabajo cada uno de los tumores individuales seleccionados para formar parte de los mismos fueron teñidos con hematoxilina-eosina (H-E) y analizados por un patólogo con el fin de señalar áreas representativas de los mismos. Estas zonas seleccionadas fueron extraídas en forma de cilindros de los bloques de parafina de cada tumor. Los cilindros se incluyeron en un nuevo bloque de parafina o micromatriz a partir del cual se pueden obtener secciones que permiten la evaluación inmunohistoquímica de todas las muestras a la vez.

### 4. Inmunohistoquímica

#### 4.1 Tumores primarios de mama

La tinción IHQ tanto de los dos genes candidatos *CUL4A* y *TFDP1* como de un completo panel de diferentes marcadores histopatológicos en tumores primarios de mama, se realizó sobre cortes histológicos de 2.5  $\mu\text{m}$  de los bloques de parafina y se introdujeron en una estufa a 55°C toda la noche. Al día siguiente, después de desparafinarlas con xilol y alcohol en concentraciones decrecientes, fueron sumergidas en citrato sódico a 10mM a pH 6.5 o EDTA a pH 9 (dependiendo del anticuerpo) y hervidas durante 2 min en el PTLINK (Dako). Tras ello, se incubaron con el anticuerpo primario 1 hora y luego, durante 20 minutos con el correspondiente anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa. Se procedió al revelado añadiendo 3,3'-diaminobencidina (DAB) y contratinción con hematoxilina (ChemMate, Dako).

Los anticuerpos seleccionados para el estudio inmunohistoquímico, las diluciones empleadas y la casa comercial a la que se compraron se enumeran en la Tabla 2. En dicha tabla también se indica el umbral a partir del cual se consideró que un tumor era positivo para la sobreexpresión del gen analizado o se especifican los distintos rangos utilizados para categorizar los niveles de expresión. Por término medio se analizaron entre 150 y 200 células de cada una de las zonas seleccionadas del TMA y se midió el porcentaje de células con inmunotinción positiva en núcleo o citoplasma, dependiendo del gen.



El anticuerpo utilizado para la valoración de CUL4A detecta la proteína que está en el citoplasma y para su evaluación se definieron 4 niveles de intensidad de inmunotinción: 0 (ausencia de inmunotinción), 1 (nivel bajo de inmunotinción), 2 (inmunotinción media) y 3 (inmunotinción intensa). Para los análisis se tuvieron en cuenta dos o tres grupos de expresión de CUL4A. En la clasificación de los tumores en dos grupos, éstos se clasificaron en función de si presentaron ausencia de inmunotinción (nivel 0) o resultó positiva (niveles 1, 2 y 3). Por otro lado, se agruparon los niveles 1 y 2 y se consideraron tres categorías: Ausencia de inmunotinción (0), nivel medio (1,2) y positivo (3). TFDP1 se localiza en el núcleo celular y para su valoración se utilizó el porcentaje medio de núcleos positivos como umbral para discriminar entre expresión negativa (<25%) o positiva ( $\geq 25\%$ ). Las muestras tumorales que presentaron inmunoreactividad en más del 60% de las células fueron categorizadas como de “alta expresión” para la asociación con el amplicón 13q34.

Tabla 2. Anticuerpos utilizados en el estudio de inmunohistoquímica en tumores humanos

Anticuerpo	Clon	Dilución	Casa Comercial	Punto de corte (%)
ER	1D5	1:30	Novocastra	10
PR	1A6	1:30	Novocastra	10
BCL2	124	1:80	DAKO	70
Ki-67	MIB1	1:30	DAKO	0-5/6-25/>25
EGFR	EGFR.113	1:10	Novocastra	*
HER-2	Herceptest	Prediluted	DAKO	3+
Cyclin D1	DCS-6	1:100	DAKO	30
Cyclin D3	DCS-22	1:10	Novocastra	*
Cyclin E	13A3	1:10	Novocastra	*
Cyclin A	6.00E+06	1:100	Novocastra	*
Cyclin B1	7A9	1:25	Novocastra	*
P53	DO-7	1:50	Novocastra	25
p21	EA10	1:50	Oncogene	*
p16	Polymouse	1:50	Santa Cruz	50
p27	57	1:1000	Transduction Lab	50
Cdk1	1	1:1500	Transduction Lab	*
Cdk2	8D4	1:500	NeoMarkers	*
Cdk4	35.1	1:10	Chemicon	*
Skp2	1G12E9	1:10	ZYMED	*
Rb	G3-245	1:250	BD PharMingen	*
E2F1	KH20-KH95	1:200	Upstate	0-46/46-55/>55
E2F6	Polygoat	1:50	Santa Cruz	*
CHEK2	DCS-270	1:25	Novocastra	60
Topoisomerase II $\alpha$	Ki-S1	1:400	DAKO	*
MDM2	IF2	1:10	Oncogen	*
CK 5/6	D5/16 B4	1:25	DAKO	*
CK 8	35BH11	1:10	DAKO	80
Vimentin	V9D	1:500	DAKO	*
Survivin	Polyrabbit	1:1000	RD Systems	*
E-Cadherin	4A2C7	1:200	Zymed	*
P-Cadherin	56	1:200	Transduction Lab	10
B-Catenin	14	1:1000	Transduction Lab	*
$\gamma$ -Catenin	15	1:1000	Transduction Lab	*
CUL4A	10693-1-AP	1:25	Proteintech Group	0/1/2/3 **
TFDP1	1DP06	1:100	NeoMarkers	25

\* Cualquier célula positiva; \*\* niveles de intensidad ya que la tinción era generalizada

## 4.2 Tumores derivados de líneas celulares humanas xenotrasplantadas en ratones

Para realizar una evaluación inmunohistoquímica de los tumores originados a partir de las líneas celulares humanas xenotrasplantadas en ratones, se llevó a cabo el mismo procedimiento indicado en el apartado anterior. En este caso los tumores se caracterizaron en cuanto a la expresión de CUL4A y de los marcadores Ki67, CD31 y LyVE-1 relacionados con la proliferación celular y los procesos de angiogenesis y linfangiogenesis, respectivamente. En el análisis de CD31 y LyVE-1 se valoró ausencia o presencia de inmunotinción y en el de Ki67 se establecieron tres niveles de intensidad de inmunoreactividad: ausente, media e intensa. Para determinar dichos niveles se utilizó el software AxioVision (Carl Zeiss, Oberkochen, Alemania) sobre las imágenes teñidas y digitalizadas con escáner Panoramic SCAN y el software Panoramic Viewer (3DHISTECH, Budapest, Hungría). En la Tabla 3 se especifican los marcadores valorados así como las diluciones utilizadas para su valoración.

Tabla 3. Anticuerpos utilizados en el estudio inmunohistoquímico de tumores derivados de xenotrasplantes

Anticuerpo	Clon	Dilución	Casa Comercial
CUL4A	#2699	1:50	Cell Signaling Technology (Danvers, MA)
MT2A	6G2	1:25	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO)
CD31		1:75	ABCAM (Cambridge, UK)
LyVE-1		1:250	ABCAM (Cambridge, UK)
Ki67	SP6	prediluido	MASTER DIAGNOSTICA (Granada, ES)

## 5. Cultivo celular

Todas las líneas celulares preseleccionadas para elegir aquellas en las que llevar a cabo los ensayos funcionales fueron cultivadas a 37°C con 5% CO<sub>2</sub>. A continuación se detallan las condiciones específicas que se utilizaron para el crecimiento de cada una de ellas.

Tabla 4. Medios de cultivo utilizados para el crecimiento de las líneas celulares

MEDIO	SUPLEMENTOS	LÍNEA CELULAR
DMEM glucosa 4500 mg/L	10% FBS, 2% P/E, 1% F	MDA-MB-157, HBL100, MFM223
RPMI-1640	10% FBS, 2% P/E, 1% F, *insulina para BT 474	BT 474, T 47D, UACC3199, Hs578T, MCF7, HCC1937, MDA-MB-436, MDA-MB-231, SKBR3, HCC1143, HCC1187, COLO824
DMEM/F12	5% HS, Insulina, Hidrocortisona, Toxina colérica, EGF, 2% P/E, 1% F	MCF10A, 184B5

FBS: suero fetal bovino. P/E: penicilina/estreptomicina. F: fungizona. HS: suero de caballo. EGF: factor de crecimiento epitelial. El medio DMEM glucosa 4500 mg/L, la fungizona, y la penicilina/estreptomicina se obtuvieron de GIBCO (Life Technologies, Carlsbad, CA). Los medios RPMI-1640, y DMEM/F12, la insulina, el EGF, la hidrocortisona, la toxina colérica y el suero fetal bovino, se obtuvieron de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). El suero de caballo se compró a Invitrogen (Life Technologies, Carlsbad, CA)

## 6. Extracción de proteínas e inmunodetección por Western blot

Con el objetivo de determinar los niveles de expresión a nivel de proteína de los genes candidatos y otros genes de interés en las líneas celulares, realizamos una inmunodetección mediante Western Blot. Esta técnica permite la detección de proteínas específicas usando anticuerpos.

Se sembró una placa de cultivos de 100 mm de diámetro de cada una de las líneas celulares. Cuando las células alcanzaron una confluencia del 70% se inició el procedimiento de extracción de proteínas. Las células se lavaron con PBS, se les añadió un buffer de digestión (RIPA Buffer: 50 mM Tris-HCl, pH 8.0, con cloruro sódico 150 mM, 1.0% Igepal CA-630 (NP-40), 0.5% desoxicolato de sodio, y 0.1% sulfato dodecílico de sodio), (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) e inhibidores de proteasas (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN) y, con la ayuda de un raspador, se procedió a la completa rotura de las células y liberación de las proteínas que se conservaron en la mezcla de RIPA e inhibidores de proteasas.

La concentración de proteínas de cada muestra se evaluó mediante un ensayo colorimétrico seguido de una solubilización con detergentes (DC Protein Assay, Bio-Rad). Cincuenta microgramos de proteínas de cada muestra se mezclaron con el apropiado volumen de agente

reductor (NuPAGE, Invitrogen, Carlsbad, CA) y buffer de carga (NuPAGE, Invitrogen, Carlsbad CA) y se calentaron en un termobloque a 70°C durante 10 minutos para desnaturalizar las proteínas. Para separar las proteínas desnaturalizadas se realizaron electroforesis en geles de poliacrilamida (NuPAGE, Invitrogen, Carlsbad, CA). Posteriormente, las proteínas se transfirieron de los geles a membranas de nitrocelulosa (Whatman) para proceder con la inmunodetección. Las membranas se incubaron una hora con los anticuerpos primarios que reconocen las proteínas a estudiar y las proteínas endógenas, utilizadas para normalizar entre muestras. Posteriormente las membranas se incubaron otra hora con los anticuerpos secundarios apropiados para reconocer el anticuerpo primario. En la detección de proteínas se usó ECL (*enhanced chemiluminescence*) (Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK), una técnica quimioluminiscente basada en la oxidación del luminol por la peroxidasa de rábano (conjugada al anticuerpo secundario) y en la emisión de luz como consecuencia de esta reacción. La intensidad de las bandas se valoró con el programa ImageJ 1.43u (Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA). Los anticuerpos y diluciones utilizadas se especifican en la Tabla 5.

Tabla 5. Anticuerpos y diluciones utilizadas en las inmunodetecciones

Anticuerpo	Clon	Dilución	Casa comercial
CUL4A	#2699	1:100	Cell Signaling Technology (Danvers, MA)
HA.11	16B12	1:1000	COVANCE (Emeryville, CA)
P21	C19	1:500	Santa Cruz Biotechnology (Heidelberg, Germany)
P27	M-197	1:500	Santa Cruz Biotechnology (Heidelberg, Germany)
P53	#2524	1:500	Cell Signaling Technology (Danvers, MA)
MT2A	6G2	1:50	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO)
$\beta$ ACTINA	AC-15	1:12000	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO)
Ab 2 <sup>ario</sup> ratón	P0447	1:5000	DakoCytomation Denmark (Glostrup, Denmark)
Ab 2 <sup>ario</sup> conejo	P0448	1:5000	DakoCytomation Denmark (Glostrup, Denmark)

## 7. Creación de líneas celulares estables mediante transducción lentiviral

Para la determinación del papel oncogénico de *CUL4A* se valoró el efecto de la sobreexpresión e inactivación del mismo mediante transducción lentiviral de las líneas celulares seleccionadas previamente como modelos experimentales.

El sistema lentiviral utilizado en la transducción se caracteriza por derivar del virus HIV-1. Las principales modificaciones que presenta con respecto a éste son la eliminación de los genes que le confieren su capacidad infecciosa y patógena, que son sustituidos por el gen de interés, y el truncamiento de la región U3 del LTR en 3' que elimina la actividad promotora de los LTRs virales. Estas modificaciones hacen que el virus generado presente deficiencias en replicación y sean necesarios plásmidos independientes que expresen en *trans* los genes necesarios para formar las partículas virales y las enzimas implicadas en el ciclo viral.

Este sistema permite la liberación, integración y expresión tanto del cDNA como de los interferentes de *CUL4A* en nuestros modelos celulares.

### 7.1 Vectores lentivirales

#### 7.1.1 Sobreexpresión

Para llevar a cabo la sobreexpresión estable de *CUL4A* en los modelos celulares seleccionados se utilizó el vector de expresión lentiviral FG12-CMV (cedido amablemente por la Dra. Marisol Soengas, CNIO, Madrid). En la figura 1 se detallan los elementos que integran la región del vector flanqueada por las secuencias LTRs. Brevemente, el vector consta de un promotor CMV seguido de un lugar de clonado múltiple (*multi cloning site*, MCS) que engloba diferentes dianas de restricción y en el que se clonó el cDNA de *CUL4A*. Además posee un gen indicador (o gen reportero) que codifica la proteína verde fluorescente (GFP, *Green Fluorescent Protein*) con un promotor independiente que se utilizó como marcador de la incorporación del transgen. El vector incluye el gen de resistencia a ampicilina que permite el proceso de selección en bacterias.

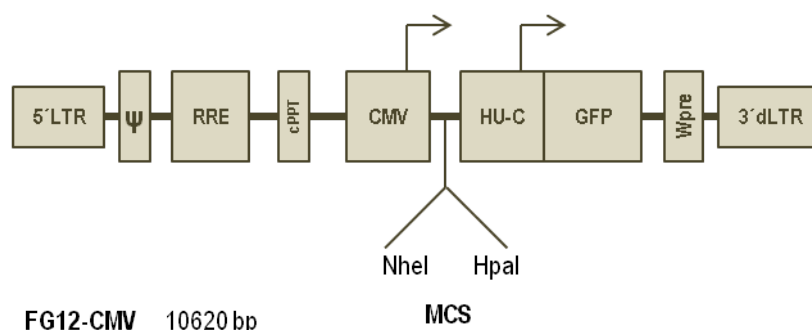


Figura 1. Esquema representativo de los elementos que integran la región del vector FG12-CMV que se encuentra entre las secuencias LTRs. 5'LTR, 3'SIN LTR: *Long terminal repeats*, son secuencias de ADN que se repiten cientos o miles de veces y flanquean los genes funcionales. Los virus usan estas secuencias para integrar sus secuencias genéticas en el genoma del hospedador. La secuencia 3'LTR presenta una delección de 400pb (*self-inactivating*, SIN) que previene tanto el inicio de la transcripción desde la 5'LTR del provirus integrado, como la capacidad del provirus de generar partículas replicativas competentes (zufferey 1998, miyoshi 1998). **Ψ, PSI**: señal de empaquetamiento: señal para el empaquetamiento del RNA viral específico en los viriones formados. **RRE**: *Rev response element*: secuencia necesaria para el correcto transporte de la totalidad del transcripto del vector lentiviral al citoplasma (exportación nuclear). **cPPT**: *central polipurine tract*: necesario para el importe nuclear del complejo de preintegración. **CMV**: promotor del citomegalovirus humano. Regula la expresión de *CUL4A*. **HU-C**: promotor de la Ubiquitina-C Humana. Regula la expresión de GFP. **GFP**: *green fluorescent protein*: gen marcador que emite bioluminiscencia en la zona verde del espectro visible. **WPRE**: *Woodchuck hepatitis virus post-transcriptional regulatory element*: elemento de regulación post-transcripcional que aumenta la estabilidad del transcripto y, por tanto, la expresión del gen de interés.

### 7.1.2 Silenciamiento

Con objeto de silenciar de manera estable la expresión de *CUL4A* en los modelos celulares preseleccionados se adquirió una batería de cinco *shRNAs* (*short hairpin RNAs*, RNAs horquillados cortos) clonados en el en el vector lentiviral pLK0.1-puro bajo el control del promotor U6 (librería de *shRNAs* MISSION, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) (Tabla 6) (Figura 2). Este vector permite la selección de células que han integrado el transgen mediante el uso de puomicina ya que contiene un gen de resistencia a este antibiótico expresado bajo el control del promotor hPGK. De los cinco *shRNAs* evaluados se seleccionaron aquellos que mejor silenciaron la expresión de *CUL4A*.

Tabla 6. Batería de *shRNAs* ensayados para el silenciamiento de *CUL4A*. .

clon	región	Secuencia de los shRNA
NM_003589.1-1076s1c1	CDS	1: CCGGGCAGAAGTATCGCAAAAGCATCTCGAGATGCTTTGCGATCAGTTCTGCTTTTT
NM_003589.1-629s1c1	CDS	2: CCGGCCAGAATATCTTAACCATGTACTCGAGTACATGGTTAAGATATCTGGTTTTT
NM_003589.1-600s1c1	CDS	3: CCGGGCCAAAGGTTAATGCAGGAAATCGAGTTTCTGCATTAACCTTTGGCTTTTT
NM_003589.1-532s1c1	CDS	4: CCGGGCAGGTGTATAAAGATTTCATCTCGAGAATGAATCTTTATACACCTGCTTTTT
NM_003589.1-3467s1c1	3'UTR	5: CCGGCCATGATATGTGGTCTAAGAATCGAGTCTTAGACCACATATCATGTTTTT

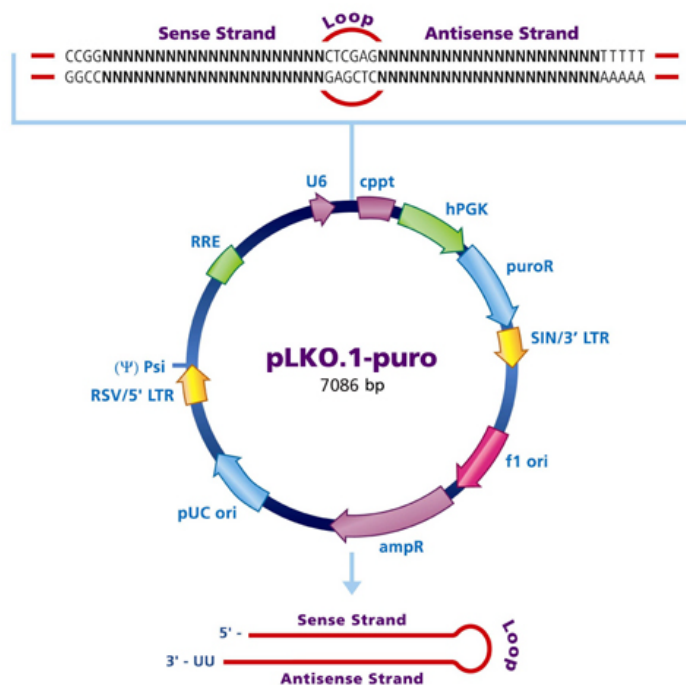


Figura 2. Esquema del vector pLKO.1. U6: promotor U6. cPPT: *central polipurine tract*. hPGK: promotor eucariótico de la quinasa fosfoglicerato humana. puroR: gen de resistencia a puromicina para la selección en mamíferos. 3'SIN LTR: *self-inactivating*, (SIN) *Long terminal repeats*. f1: origen de replicación del fago F1. ampR: gen de resistencia a ampicilina para la selección en bacterias. pUC ori: origen de replicación pUC. 5'LTR: *Long terminal repeats*. Ψ, PSI: señal de empaquetamiento del RNA. RRE: *Rev response element*.

## 7.2 Plásmidos de empaquetamiento y plásmido de la envuelta

Los plásmidos de empaquetamiento y el plásmido de la envuelta que a continuación se detallan procedieron del laboratorio de la Dra. Marisol Soengas (CNIO, Madrid). Se usaron en las producciones lentivirales tanto en los experimentos de sobreexpresión como en los de silenciamiento.

Los plásmidos de empaquetamientos utilizados fueron pMDLg/pRRE y pRSV-rev. El primero expresa los genes *GAG* (codifican las principales proteínas estructurales del virión) y *POL* (codifica las enzimas necesarias para el ciclo viral como la transcriptasa inversa, la integrasa y la proteasa). El segundo, expresa el gen *REV* que codifica un regulador post-transcripcional necesario para una expresión eficiente de gag y pol.



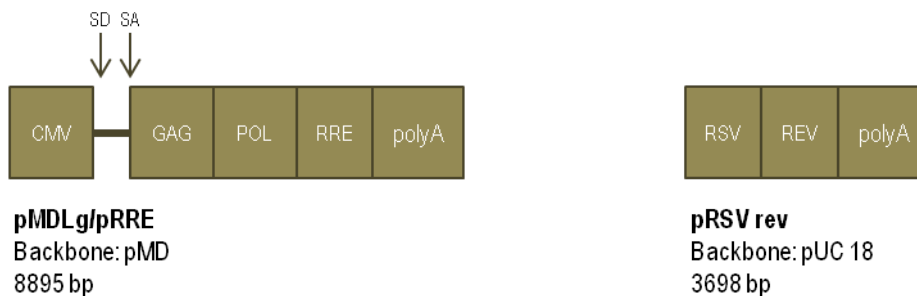


Figura 3. Esquemas representativos de los elementos más importantes de los vectores pMDLg/pRRE y pRSV-rev. **CMV**: promotor del citomegalovirus humano. **GAG**: genes que codifican para las principales proteínas estructurales del virión. **POL** codifica las enzimas necesarias para el ciclo viral como la transcriptasa inversa, la integrasa y la proteasa. **RRE**: *Rev response element*. **PolyA**: señal de poliadenilación. **RSV**: promotor del virus del sarcoma de Rous. **REV**: codifica un regulador post-transcripcional necesario para una expresión eficiente de gag y pol.

Cómo plásmido de la envuelta se utilizó el pHCMV-G que contiene el gen VSV-G que codifica para la proteína de la envuelta del virus de la estomatitis vesicular.

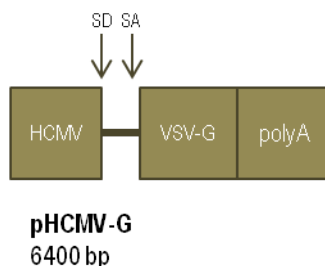


Figura 4. Esquema representativo de los elementos más importantes del vector pHCMV-G. **CMVH**: promotor del citomegalovirus humano. **VSV-G**: Glycoprotein G del virus de Stomatitis Vesicular. Los virus pseudotipados con VSV-G entran en la célula interaccionando con fosfolípidos de la membrana celular, lo que les confiere la capacidad de infectar una amplia variedad de tipos celulares y especies, incluyendo insectos, peces, humanos, ratón y rana. **PolyA**: señal de poliadenilación.

### 7.3 Clonación del cDNA de CUL4A en el vector FG12

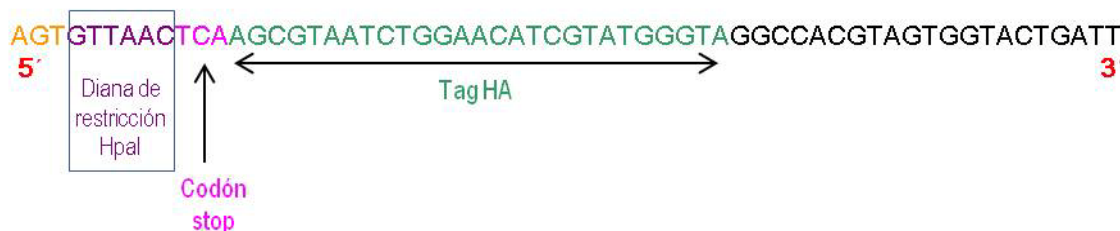
El cDNA de *CUL4A* usado en la clonación procedió de la librería de cDNAs del CNIO y se obtuvo integrado en el plásmido pOTB7 (ID CNIO: hAE5834). Se amplificó por PCR con la enzima *Platinum High Fidelity* (Invitrogen, Carlsbad CA). Para la amplificación se diseñó una pareja de cebadores en la que se incluyeron las dianas de restricción para las enzimas *NheI* y *HpaI*. Estas dianas se seleccionaron para la clonación por estar contenidas en el MCS del vector FG12-CMV y por no encontrarse las secuencias el cDNA de *CUL4A*. Además, se incorporó un *tag* o secuencia indicadora de 9 aminoácidos derivada de la hemaglutinina (HA) en el cebador reverso. Este *tag*,

añadido tras el cDNA de *CUL4A* y en el mismo marco de lectura, facilita la detección e identificación de la proteína CUL4A exógena.

Cebador directo:



Cebador reverso:



**Figura 5. Secuencias de los cebadores directo y reverso empleados en la amplificación del cDNA de *CUL4A*.** Se recuadran las secuencias diana para las enzimas de restricción NheI y HpaI y se señalan las secuencias Kozak, codón stop y del tag HA. En el extremo 5' de cada cebador se añadieron 3-4 bases para favorecer el posterior anclaje de las enzimas de restricción.

Tras la purificación de los productos de PCR se digirieron el cDNA y el vector FG12-CMV con la combinación de enzimas seleccionadas, NheI y HpaI (New England Biolabs, Ipswich, MA). Los productos de las digestiones se corrieron en un gel de agarosa, se cortaron las bandas que contenían el DNA de ambas reacciones y se purificó el ADN contenido en las mismas (Qiaex II, Qiagen, Hilden, Germany). Posteriormente, vector e inserto en proporción 1:3 se ligaron con una Ligasa T4 (New England Biolabs, Ipswich, MA). La reacción de ligación se efectuó en un volumen final de 20 µl, a temperatura ambiente durante 10 minutos. Se incluyó en paralelo un control negativo consistente en la ligación del vector sin inserto.

A continuación se amplificó el producto de ambas ligaciones mediante transformación bacteriana. Las bacterias transformadas se sembraron en placas de LB (Laboratorios Conda, Torrejón de Ardoz, Madrid, España) con ampicilina, de forma que tras 24 horas a 37°C crecieron aquellas bacterias que contenían el vector con la resistencia al antibiótico. Se seleccionaron

aleatoriamente de 10-12 colonias derivadas de la transformación con el producto de ligación del vector e inserto, se aisló el DNA mediante miniprep y se digirió con la misma combinación de enzimas con la que se clonó para comprobar el resultado de la ligación. Se prepararon stocks a partir de las minipreps cuyos DNAs extraídos produjeron el patrón de restricción esperado y que tras secuenciación directa correspondían a la secuencia correcta del cDNA.

#### **7.4 Producción de sobrenadantes lentivirales**

Para la producción de sobrenadantes lentivirales se usó la línea celular 293FT (R700-07 Invitrogen, Carlsbad, CA). Esta línea, derivada de células de riñón humano, está genéticamente modificada mediante la integración del plásmido pCMVSPORT6TA<sub>g</sub>.neo que expresa de manera estable el antígeno T grande del virus SV40, cuya presencia facilita la óptima expresión de los virus.

La producción de sobrenadantes lentivirales se realizó mediante cotransfección transitoria de la línea 293FT con los vectores de transferencia lentivirales (FG12-CMV-CUL4A en los experimentos de sobreexpresión o pLK0.1puro-CUL4AshRNAs en los experimentos de silenciamiento) y los plásmidos de empaquetamiento y de la envuelta descritos previamente (Figuras 3 y 4). En paralelo y mediante el mismo procedimiento se produjeron virus con los vectores lentivirales control (FG12-CMV o pLK0.1puro-scramble para los experimentos de sobreexpresión y silenciamiento, respectivamente). El vector pLK0.1puro-scramble expresa un shRNA que, aunque activa RISC y la maquinaria de RNA interferente, no reconoce ningún gen humano o de ratón.

El día previo a la transfección, las células 293FT se sembraron en placas de cultivo de 100 mm de diámetro en una concentración adecuada para al día siguiente disponer de un cultivo en confluencia de entre 90-95%.

La transfección transitoria se efectuó con el reactivo comercial FuGENE 6 *Transfection Reagent* (Promega, Madison, WI) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se cotransfectaron 4 µg de cada uno de los vectores y se trabajó con el ratio 3:1, FuGENE 6 (µl):DNA (µg). Para la formación de los complejos FuGENE:DNA se usó el medio OPTIMEM (Gibco) libre de suero. Los complejos se añadieron gota a gota directamente sobre las células 293FT. Los sobrenadantes con las partículas virales infectivas se recogieron 36 horas después de la transfección (solo se recogió un

sobrenadante por producción lentiviral), se filtraron con un filtro de 45µm para eliminar restos celulares y se almacenaron a -80°C o se utilizaron directamente para infectar los modelos celulares.

## 7.5 Infecciones lentivirales

La transducción de los modelos celulares se llevó a cabo mediante dos infecciones lentivirales consecutivas de los mismos.

Tres mililitros de los sobrenadantes filtrados que contenían las partículas virales infectivas se suplementaron con 10 µl de polibreno (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), 1 ml de FBS (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) y el medio de la correspondiente línea celular hasta alcanzar los 10 ml de volumen final. El polibreno (hexadimethrine bromide) es un polímero catiónico usado para incrementar la eficiencia de infección en cultivo celular. Actúa neutralizando la carga de repulsión entre los viriones y el ácido siálico de la superficie celular.

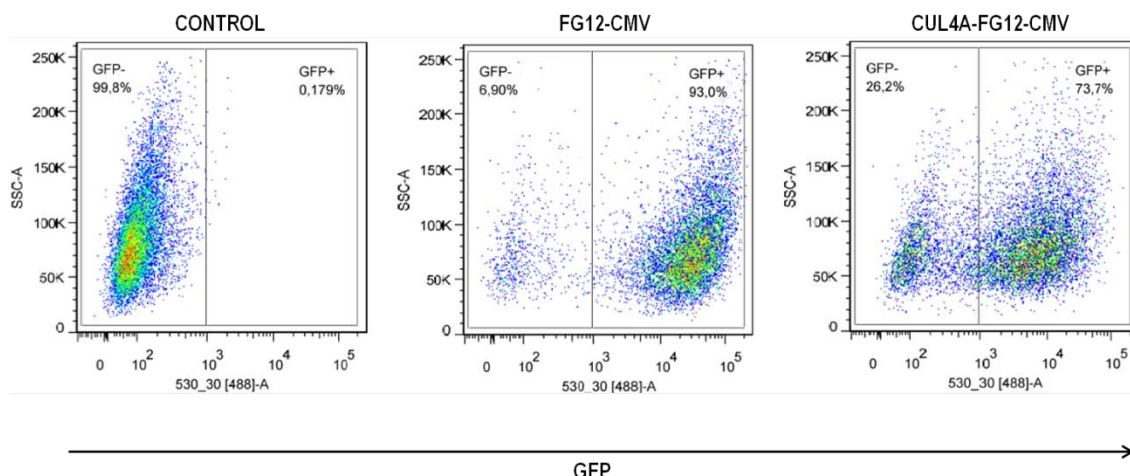
El preparado se añadió directamente sobre las células. Estas se introdujeron en el incubador. Una segunda infección se efectuó transcurridas 6-8 horas procediendo de la misma manera.

## 7.6 Selección de células transducidas de forma estable

Con objeto de obtener líneas celulares que sobreexpresasen o silenciases *CUL4A* de manera estable se procedió a la selección de las células transducidas, una vez transcurridas 48 horas tras la segunda infección lentiviral, mediante dos procedimientos diferentes en función del modelo celular:

Modelo de sobreexpresión de CUL4A: Las células transducidas con el vector lentiviral que contenía el cDNA de *CUL4A* o el vector vacío se seleccionaron mediante citometría de flujo (FACSCalibur, BD Bioscience, San Jose, CA), purificándose aquella población de células que expresaba la proteína verde fluorescente (GFP) (Figura 6). El gen codificante de esta proteína forma parte de dicho vector (ver apartado 7.1.1) y se pudo utilizar como marcador de la incorporación del mismo y por lo tanto del cDNA exógeno de *CUL4A* (o del vector vacío en el caso del experimento control). A lo largo del proceso de expansión de las células seleccionadas se monitorizó

periódicamente en el microscopio de fluorescencia el mantenimiento de la expresión de la proteína verde fluorescente.



**Figura 6.** Selección de las células transducidas con los vectores FG12-CMV o CUL4A-FG12-CMV. Se muestran los histogramas representativos de la selección de células positivas para la expresión de GFP en tres tipos celulares: células control no infectadas, células infectadas con el vector vacío (FG12-CMV) y células infectadas con el vector clonado con el cDNA de CUL4A (CUL4A- FG12-CMV). Los números en los *dot plot* indican el porcentaje de células en el respectivo cuadrante que fueron negativas (-) o positivas (+) para la expresión de GFP.

Modelos de silenciamiento de CUL4A: Las células transducidas con los vectores lentivirales que contenían los diferentes shRNA específicos para *CUL4A* o el pLK0.1 puro-scramble se seleccionaron mediante puromicina (1µg/ml) ya que dichos vectores contiene un gen de resistencia a dicho antibiótico (Figura 2). Las células se mantuvieron en presencia de puromicina una semana cambiando el medio cada dos días. Dos días tras la adición de puromicina, se observó que en el control negativo (línea celular no infectada) en torno al 90% de las células estaban muertas.

## 8. Experimentos *In vitro*

### 8.1 Proliferación celular

En función de la línea celular, se sembraron 1500 o 2500 células por pocillo en placas de 96 pocillos con base transparente (BD Bioscience, San Jose, CA). Se sembraron 7 placas (seis pocillos por placa) por línea celular y cada 24h durante 7 días se cuantificaron las células viables usando el kit comercial *CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay* (Promega, Madison, WI) de acuerdo

con las instrucciones del fabricante. El ensayo del *CellTiter-Glo*® se basa en la emisión de una señal luminiscente proporcional a la cantidad de ATP presente en los lisados celulares. La cantidad de ATP a su vez sería un indicador del número de células metabólicamente activas. La intensidad de la señal luminiscente emitida por el cultivo celular se midió con el aparato Wallac 1420 VICTOR<sup>2</sup>™ (PerkinElmer, Waltham MA). El valor de luminiscencia correspondiente a cada uno de los siete días evaluados en el experimento se determinó calculando la media de los seis pocillos sembrados por placa y línea celular. Los resultados fueron normalizados con respecto a la emisión obtenida inmediatamente después de sembrar las células (día cero).

## 8.2 Apoptosis

Para la identificación de células en apoptosis temprana y tardía se usó el kit comercial FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit I (BD Pharmigen, San Diego, USA). Brevemente, las células en un 70% de confluencia se recogieron y resuspendieron en 100 µl de *binding* buffer 1X del kit consiguiendo una concentración final de  $3 \times 10^6$  células/ml. Se añadieron 5 µl de Annexin V a las células y se incubaron durante 15 minutos en oscuridad y a temperatura ambiente. Tras incorporar 400 µl más de *binding* buffer 1X y añadir 2-3 µl de DAPI (200 µg/ml), las muestras se analizaron mediante FACS (*Fluorescence Activated Cell Sorter*).

## 8.3 Ciclo celular y cuantificación de la fase S

Para el análisis del ciclo celular se analizó el contenido total del ADN mediante tinción con yoduro de propidio (PI) y posterior análisis por citometría de flujo. Además para cuantificar el porcentaje de células en fase de síntesis (fase S) se utilizó bromodesoxiuridina (BrdU), un análogo sintético de la timidina que añadido al medio celular se incorpora al ADN de células en proceso de replicación.

Brevemente, las células en crecimiento exponencial se trataron con BrdU 10 µM durante 30-60 minutos, se recogieron y fijaron en etanol al 70% en PBS, se lavaron con PBS y se trataron con HCL 2M durante 30 minutos. Para la detección de BrdU las células se incubaron 20 minutos con el anticuerpo monoclonal BrdU (BD Bioscience, San Jose, CA) y posteriormente 20 minutos con el anticuerpo secundario conjugado con FITC (Polyclonal Rabbit Anti-Mouse Immunoglobulins/FITC Rabbit F(ab')<sub>2</sub>, Dako Cytomation). A continuación las células se incubaron en PBS con ribonucleasa

(10 mg/ml, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) y PI (50 µg/ml) durante 30 minutos en oscuridad. Los resultados se analizaron mediante FACSCalibur (BD Bioscience, San Jose, CA). Se analizaron, al menos, 10.000 eventos individuales por muestra y experimento (tres por línea). Los datos se analizaron usando FlowJo software (Treestar, Oregon).

## **8.4 Ensayos de formación de colonias**

Para estudiar el efecto de la modificación de los niveles de expresión de *CUL4A* en la capacidad de formación de colonias de los distintos modelos celulares se realizaron ensayos en condiciones dependientes e independientes de anclaje.

### **8.4.1 Formación de colonias en condiciones dependientes de anclaje**

Las células se tripsinizaron, se recogieron en medio fresco y se contaron. Dependiendo de la línea celular, se sembraron a una densidad de 1500 o 2500 células por pocillo en placas de 6 pocillos. Tras 9-10 días de incubación, se lavaron con PBS frío, se fijaron con metanol frío durante 10 minutos y se tiñeron con cristal violeta al 0.1% durante 10-20 minutos. El exceso de tinción se eliminó mediante lavados consecutivos con agua. Para la determinación cuantitativa de la fracción de células vivas, el cristal violeta de las células teñidas se solubilizó en ácido acético al 15% durante una hora en un agitador. La absorbancia de la solución, proporcional al número de células, se midió a 590 nm en un lector de microplacas Wallac 1420 VICTOR<sup>2</sup>™ (PerkinElmer, Waltham MA). Se realizaron tres ensayos por línea celular cada uno con tres o seis réplicas experimentales.

### **8.4.2 Formación de colonias en condiciones independientes de anclaje**

Para la valoración de la capacidad de crecimiento de los modelos celulares en condiciones independientes de anclaje se realizaron experimentos de formación de colonias en *soft agar*.

Se preparó un stock autoclavado de agar (Fluka Agar, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) al 3% en PBS. Durante el experimento se mantuvo a 70°C en el baño maría para evitar su solidificación. El stock al 3% se diluyó 1:5 con el medio precalentado a 37°C específico para cada modelo celular. Se repartió 1 ml de la nueva dilución al 0.6% en cada uno de los pocillos de placas de 6 pocillos y se

dejó enfriar, formándose una capa basal que evita que las células entren en contacto con el fondo del pocillo. A continuación las células se tripsinizaron, se recogieron en medio fresco y se contaron. Por triplicado, se resuspendieron 30.000 células en 1 ml de medio precalentado que se mezcló con 1 ml de la dilución de soft agar al 0.6%. Esta nueva dilución al 0.3% con las células se depositó sobre la de 0.6%. Una vez enfriada se añadió 1 ml de medio. Transcurridas 3 semanas, las colonias se tiñeron con MTT (dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazol) (1 mg/ml, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) y se contaron. Se realizaron dos ensayos por línea celular cada uno de ellos con tres réplicas experimentales.

### 8.5 Ensayo de cooperación oncogénica

Para evaluar la cooperación de la expresión de *CUL4A* con la de los oncogenes *c-Myc* y *H-ras* en la adquisición de un fenotipo transformado por parte de la línea 184B5 se realizó la transducción mediante un sistema retroviral de *c-Myc* y *H-ras* por separado o en conjunto y se realizó un experimento de formación de colonias en condiciones independientes de anclaje.

Para la expresión estable de *c-Myc* se usó el vector de transferencia retroviral pBabe-Puro-*c-Myc* que expresaba el gen de resistencia a puromicina. Por otro lado, se utilizó el vector pBabe-Neo-*H-Ras-V12* que contenía el gen de resistencia a neomicina para la expresión estable de *H-Ras* mutante en valina 12. Ambos vectores y el plásmido de empaquetamiento retroviral *pCL-Ampho* fueron cedidos amablemente por el Dr. Víctor Javier Sánchez-Arévalo (CNIO).

La producción de los sobrenadantes retrovirales que contuvieron *c-Myc* o *H-Ras-V12* se realizó mediante la cotransfección transitoria de la línea 293FT usándose el reactivo FuGENE 6 Transfection Reagent (Promega, Madison, WI) de los vectores de transferencia retroviral pBabe-Puro-*c-Myc* y pBabe-Neo-*H-Ras-V12* y el plásmido de empaquetamiento *pCL-Ampho* siguiendo el procedimiento indicado en el apartado 7.4.

Tanto las células 184B5 generadas mediante infección lentiviral para expresar de forma estable *CUL4A* como las células control (infectadas con el vector FG12) se infectaron de la manera indicada en el apartado 7.5 con los sobrenadantes retrovirales que contuvieron *c-Myc* o *H-ras-V12*. Tras la selección celular apropiada para las células infectadas, puromicina para las células



transducidas con *c-Myc* y neomicina para las transducidas con *H-Ras-V12*, las células que expresaron establemente *c-Myc* se sometieron a una segunda infección retroviral con los sobrenadantes que contuvieron *H-Ras-V12* seguida de la correspondiente selección con neomicina.

Posteriormente, se comprobó la sobreexpresión del gen (o genes) transducido(s) mediante WB y se realizó un ensayo de formación de colonias en condiciones independientes de anclaje procediendo de la manera indicada en el apartado 8.4.2.

### **8.6 Ensayo de estabilidad de proteínas**

Para estudiar modificaciones en los niveles de proteínas que se han descrito como dianas de ubiquitinación (y posterior degradación proteosomal) mediada por *CUL4A* se llevó a cabo un análisis de estabilidad de proteínas. Las células se sembraron en placas de 60 mm de diámetro, se crecieron hasta llegar a una confluencia del 60-70% y se trataron con cicloheximida, un inhibidor de la síntesis proteica en eucariotas (40 µg/ml, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) o con el vehículo (agua). Se recogieron proteínas (ver apartado 6, Extracción de proteínas) en diferentes tiempos (0, 0.5, 1, 2.5, 5 y 10 horas tras el tratamiento) y se realizaron inmunodetecciones con anticuerpos específicos mediante Western Blot (ver apartado 6, Western Blots). Los anticuerpos y diluciones empleadas se detallan en la Tabla 5.

## **9. Experimentos *In vivo***

El procedimiento que a continuación se detalla fue revisado por el Comité de Ética de la Investigación y de Bienestar Animal del Instituto de Salud Carlos III y cumplió con los requisitos contenidos en el Real Decreto 1201/2005 de 10 de octubre (BOE 21 de octubre) sobre protección de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos.

El acondicionamiento de los animales se estableció por la Unidad del Animalario del CNIO y se reguló por el Real Decreto 1201/2005 (Anexo II) y por la Directiva Europea 2010/63/EU (Anexo III). Brevemente, las condiciones de alojamiento fueron: 15 a 20 renovaciones de aire por hora, temperatura de 20-24°C, humedad del 55% +/- 10% períodos de 12 horas de luz y oscuridad y

aislamiento de ruidos que pudiesen afectar el bienestar de los animales. Se distribuyeron 5 ratones por caja de 530 cm<sup>2</sup>. Y se alimentaron con pienso (Harlan Teklad, Indianapolis, IN) autoclavado y agua filtrada y autoclavada.

Para el estudio de la implicación de *CUL4A* en el desarrollo y/o progresión del cáncer de mama en modelos *in vivo*, se desarrollaron xenotrasplantes ortotópicos de los modelos celulares modificados en ratones hembra Hsd:Athymic Nude-Foxn1<sup>nu</sup> de seis semanas de edad.

En primer lugar mediante un experimento piloto se comprobó que las líneas parentales no modificadas MDA-MB-157 y HCC1937 eran capaces de formar tumores al implantarlas en las mamas de los ratones Hsd:Athymic Nude-Foxn1<sup>nu</sup>. Una vez realizada esa comprobación nuestro objetivo fue determinar si el silenciamiento de *CUL4A* en estas células disminuía o impedía la formación de dichos tumores.

Para el diseño experimental se realizaron los cálculos necesarios con el objetivo de utilizar el menor número de ratones posible y obtener resultados estadísticamente significativos. Finalmente, se utilizaron 20 ratones por experimento independiente, 10 ratones por línea celular (silenciamiento y control). Además cada ratón se inoculó dos veces (en las mamas inguinales derecha e izquierda).

Los ratones se anestesiaron con isoflurano al 2%. Se efectuó una inyección subdérmica por glándula mamaria (dos inyecciones por animal: mamas izquierda y derecha), en el ducto que conecta los pezones de las mamas inguinales 4<sup>a</sup> y 5<sup>a</sup>. Se inoculó un millón o dos millones de células dependiendo de la línea celular (un millón para HCC1937, dos millones para MDAMB157 y 184B5) en 50 µl de una solución formada por el medio específico de la línea celular (sin suero) y matrigel (BD Bioscience, San Jose, CA) a una dilución 1:1.

El postoperatorio se llevó a cabo mediante una inyección subcutánea de buprenorfina (0.05 mg/kg) y el emplazamiento de los ratones bajo una lámpara de calor hasta su total recuperación. Los tumores se midieron semanalmente con un calibre y el volumen tumoral se calculó usando la fórmula  $0.5ab^2$  (a y b, diámetros largo y corto, respectivamente). Los valores de los volúmenes tumorales comenzaron a considerarse para el análisis estadístico una vez alcanzaron los 100 mm<sup>3</sup>.

Los animales se observaron dos veces por semana y se evaluaron signos como diarrea, emesis, inapetencia, letargia, y pérdida de peso. Se trató de terminar el estudio tan pronto como fuese posible para minimizar los efectos adversos del procedimiento. Los ratones se sacrificaron mediante CO<sub>2</sub> cuando los tumores alcanzaron un tamaño de 1.2 cm<sup>3</sup> o apareció cualquiera de los síntomas descritos en la OECD (*Guidance Document for the Recognition, assessment, and use of clinical signs as Humane Endpoint for Experimental Animal Used in Safety Evaluation*), como fue el inicio de ulceración de la zona tumoral.

Una vez sacrificados los animales, se extirparon los tumores junto con la mama en la que se desarrollaron y los pulmones. Los tumores se pesaron, se fotografiaron (CARACTERÍSTICAS CÁMARA) y se partieron en dos mitades. Los órganos y una de las mitades de los tumores se fijaron en una solución de formalina al 10% (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) y se embebieron en parafina; el resto de tumor se congeló y se conservó a -80°C.

## 10. Cambios globales en la expresión proteica: iTRAQ

Para estudiar cambios globales en la expresión proteica potencialmente mediados por los niveles de *CUL4A* se realizó un análisis de las proteínas diferencialmente expresadas entre los modelos celulares de silenciamiento y sobreexpresión del *CUL4A* y sus respectivos controles. Para ello se utilizó la técnica iTRAQ (*isobaric tags for relative and absolute quantitation*) (Ross PL, Huang YN, Marchese JN, Williamson B, Parker K, Hattan S, Khainovski N, Pillai S, Dey S, Daniels S, Purkayastha S, Juhasz P, Martin S, Bartlett-Jones M, He F, Jacobson A, Pappin DJ (2004) Multiplexed Protein Quantitation in *Saccharomyces cerevisiae* using Amine-Reactive Isobaric Tagging Reagents. *Mol. Cell. Proteomics* 3, 1154-1169) basada en la espectrometría de masas y el marcaje isobárico diferencial.

Se partió de los lisados celulares conservados en RIPA (ver apartado 6) procedentes de las células con silenciamiento y sobreexpresión de *CUL4A* así como de las células control. En primer lugar se añadió benzonasa al 0.1% (Novagen, Darmstadt, Germany) a los lisados para degradar los restos de DNA y la fracción proteica se precipitó con acetona fría para posteriormente rehidratarla con urea 7M y tiourea 2M. Seguidamente se midió la concentración de las muestras y se procedió a

su digestión mediante el método FASP (*Filter aided sample preparation*) (Wisniewski, J.R., Zougman, A., Nagaraj, N. & Mann, M. (2009) Universal sample preparation method for proteome analysis. *Nat Methods* 6, 359-362)

Cada muestra (100 µg de proteína) fue sometida a dos digestiones consecutivas. La primera digestión se realizó con la endoproteinasa Lys-C (Wako Chemicals, North Chesterfield, Virginia) toda la noche a temperatura ambiente en un ratio enzima:proteína 1:50. La segunda digestión, de 6 horas de duración, se realizó con tripsina (Promega; Madison, WI) a 37°C. A continuación se llevó cabo el marcaje isotópico de las aminos reactivas presentes en los péptidos procedentes de cada digestión trípica siguiendo las recomendaciones del fabricante (Applied Biosystems, Life Technologies, Carlsbad, CA). Posteriormente, las muestras de iTRAQ se purificaron usando un cartucho Sep-Pak C-18 en fase reversa (Waters Corp., Milford, MA).

Los péptidos eluidos y marcados se reconstituyeron en la solución OFFGEL (10% glicerol:agua (1:1), 1% anfolitos pH 3-10) para el posterior fraccionamiento de cada digestión trípica mediante isoelectroenfoque. Para ello se usó el sistema 3100 OFFGEL Fractionator (Agilent Technologies, Palo Alto, CA). Las tiras IPG (gradiente inmovilizado de pH) de 24 cm (GE Healthcare, München, Germany) con un rango linear de pH 3-10 se rehidrataron durante 15 min siguiendo las instrucciones del fabricante. A continuación se cargaron 150 µL de muestra en cada uno de los 24 pocillos, y la separación de los péptidos en base a su punto isoeléctrico se realizó a 20°C y 50 µA hasta que se alcanzó el nivel 50 kVh. Cada fracción se evaporó y se sometió a un desalado empleando puntas "Stage" con discos C8 (3M, Minneapolis, MN) (Rappsilber, J., Ishihama, Y. & Mann, M. (2003) Stop and go extraction tips for matrix-assisted laser desorption/ionization, nanoelectrospray, and LC/MS sample pretreatment in proteomics. *Anal Chem* 75, 663-670) rellenas de resina R3 (Applied Biosystems). Finalmente, las fracciones peptídicas se evaporaron y resuspendieron en H<sub>2</sub>O con FA al 0.1% (v/v).

Las muestras se separaron mediante nano-cromatografía de líquidos de fase reversa en un sistema nanoLC Eksigent (Eksigent Technologies) y analizadas mediante espectrometría de masas en un LTQ Orbitrap Velos (Thermo Scientific, Bremen, Germany) equipado con una fuente nanoESI (nano-electrospray ionization) (Proxeon Biosystems, Odense, Denmark).

Las muestras se inyectaron en el sistema empleando un autosampler AS-2 (Eksigent) y se preconcentraron y desalaron en línea empleando un cartucho de fase reversa ReproSil Pur C18-Aq 5  $\mu$ m 0.3 x 10 mm (SGE Analytical, Australia) durante 5 min a 2.5  $\mu$ L/min con 0.1% FA. Los péptidos eluyeron desde una columna cromatográfica de fase reversa ReproSil Pur C18-AQ 3  $\mu$ m 200 x 0.075 mm (Dr. Maisch GmbH, Ammerbuch-Entringen, Germany) mediante un gradiente binario empleando 2% ACN in 0.1% FA (fase móvil A) y 100% ACN en 0.1%FA (fase móvil B), a un flujo de 300 nL/min y temperatura constante 30°C. Los péptidos se separaron utilizando el siguiente gradiente: 0-5 min 2% B, 5-150 min 45% B y 150-165 min 98% B.

El espectrómetro de masas LTQ Orbitrap Velos se empleó en modo de ionización positivo. El escaneo MS se realizó en el analizador FT (Fourier Transform) barriendo una ventana entre 250 and 1750  $m/z$ . La resolución se fijó a 60 000 FWHM (Full width at half maximum) a  $m/z$  400 y el control automático de ganancia (AGC) se fijó a 500 000 iones. Los valores de  $m/z$  que desencadenaban un evento MS/MS se incluyeron en una lista de exclusión durante 60 s. La mínima señal en MS para desencadenar un evento MS/MS se fijó a 1000 cuentas. En todos los casos, se registró un microscan. La opción "lock mass" se habilitó para los modos MS y MS/MS, de manera que los iones polidimetil ciclosiloxano (PDMS, protonado  $(\text{Si}(\text{CH}_3)_2\text{O})_6$ ;  $m/z$  445.120025) se emplearon para la recalibración interna de los espectros de masas (Olsen, J.V., *et al.* (2005) Parts per million mass accuracy on an Orbitrap mass spectrometer via lock mass injection into a C-trap. *Mol Cell Proteomics* 4, 2010-2021).

Para la fragmentación HCD (high energy collision dissociation), los 15 patrones isotópicos más abundantes con carga  $\geq 2$  del escaneo de barrido se seleccionaron con una ventana de aislamiento de 2  $m/z$  y fragmentados en la celda de colisión C-trap aplicando una energía de colisión normalizada del 42%. Los fragmentos resultantes se detectaron en el sistema Orbitrap con una resolución de 7500 FWHM a  $m/z$  400. Los máximos tiempos de inyección de iones para el escaneo de barrido y el MS/MS se fijaron a 500 ms y 250 ms respectivamente y los *ion target values* se fijaron a 1E6 y 4E5, respectivamente.

Los datos se procesaron usando el programa informático Proteome Discoverer 1.3.0.339 (Thermo Scientific). Los espectros de fragmentación se compararon con la base de datos SwissProt Human (versión Marzo 21, 2012) usando MASCOT como dispositivo de búsqueda (v 2.2). La

identificación de péptidos y proteínas se filtró con un *false discovery rate* (FDR) al 1%. Tan solo se consideraron los péptidos de elevada confianza. Los resultados se exportaron en una hoja de Excel para la interpretación manual de los datos. Aunque el software Proteome Discoverer proporcionó una cuantificación relativa y algunos datos estadísticos, se seleccionaron puntos de corte adicionales para los ratios de expresión de iTRAQ con el objetivo de identificar proteínas sobreexpresadas y reprimidas. Se establecieron dos niveles de exigencia, uno más permisivo (ratio<0.833, represión; ratio>1.2, sobreexpresión) y, otro más restrictivo (ratio<0.7, represión; ratio>1.3, sobreexpresión). En el análisis tan solo se tuvieron en consideración las proteínas que se identificaron a través de 2 o más péptidos únicos y de las que, al menos, se contaron tres péptidos marcados con el reactivo iTRAQ.

## 11. Cambios globales en la expresión génica: *arrays* de expresión

Para estudiar cambios globales en la expresión génica de mediados por la modificación de los niveles de expresión de *CUL4A* se utilizaron *microarrays* de expresión de la plataforma *Human Gene Expression G3 8x60K* de Agilent (ID 028004, P/N G4851A, Agilent, Santa Clara, CA).

En primer lugar se valoró la integridad del RNA total procedente de los modelos celulares utilizando el kit RNA 6000 Nano Assay y el Bioanalyzer Agilent 2100 (Agilent Technologies, Palo Alto, CA), comprobándose que la integridad de las muestras se encontraba en el rango de 8.4 a 10.0. A continuación se procedió al marcaje de 100 ng de RNA mediante el kit comercial *One-Color Microarray-Based Gene Expression Analysis Low Input Quick Amp Labeling* versión 6.5 (Agilent, Santa Clara, CA) siguiendo las indicaciones del fabricante. Brevemente, se usó la enzima MMLV-RT en la retrotranscripción de los RNAs usándose cebadores que contienen la secuencia promotora del fago T7. Para la posterior generación del cRNA se usó enzima T7 RNA polimerasa que catalizó la reacción *in vitro* de transcripción en presencia del fluoróforo Cy3-CTP. Las muestras marcadas siguieron un proceso de purificación en columna con el Kit comercial *RNeasy* (Qiagen, Hilden, Germany). Se usaron 600 ng de cRNA amplificado en la hibridación que se efectuó en las cámaras de hibridación SureHyb (Agilent Technologies, Palo Alto, CA) en un volumen final de 50 µl a una temperatura de 65°C durante 17 horas. Los cristales se digitalizaron usando el escáner G2505C *DNA Microarray* (Agilent Technologies, Palo Alto, CA) y las imágenes se cuantificaron usando el software *Agilent Feature Extraction* (versión 10.7).

## 12. Análisis estadísticos

Para comparar los niveles de expresión de RNA mensajero entre los dos grupos de muestras se aplicó el test U-Mann Whitney. A fin de determinar asociaciones entre los grupos tumorales (tumores con o sin amplicón en 13q34) con la sobreexpresión de CUL4A o TFDP1, características clínicas y marcadores inmunohistoquímicos se utilizó el test chi-cuadrado de Pearson corrigiendo cuando se necesitó con la prueba exacta de Fisher. Los resultados derivados de los ensayos *in vitro* se analizaron mediante comparación de medias empleando el test de t de Student. Los resultados de los experimentos *in vivo* se analizaron por comparación de medianas mediante un test de U de Mann-Whitney. Se usó el software estadístico SSPS para Windows (SSPS, Inc., Chicago, IL) en el análisis de los datos y las comparaciones estadísticas.





# Resultados



## 1. Caracterización del amplicón 13q34: selección de genes candidatos

### 1.1. Correlación entre la presencia de la amplificación en 13q34 y los niveles de mRNA de los genes localizados en la región mínima amplificada

En trabajos previos desarrollados por el grupo se llevó a cabo la caracterización genómica de un conjunto de muestras de cáncer de mama familiar y esporádico mediante hibridación genómica comparativa o CGH. A través del estudio del patrón de aberraciones genómicas de estos tumores se llegó a la identificación de una amplificación recurrente en la región cromosómica 13q34. Además, se definió la frecuencia de la amplificación en 13q34 mediante hibridación fluorescente *in situ* o FISH en TMAs de tumores de mama determinándose su presencia en el 4.5% de los casos de cáncer de mama familiar y esporádico estudiados. Además, se encontró que la presencia de la amplificación era mayor en los tumores asociados con mutaciones en *BRCA1* (8.1%) y se incrementaba en tumores de fenotipo basal (20%).

Esta amplificación podría estar confiriendo una ventaja selectiva a aquellas células que la contuviesen mediante el aumento del número de copias de posibles oncogenes incluidos en ella y que contribuirían al desarrollo del tumor. Por ello, se procedió al estudio detallado de aquellos casos que presentaron la aberración genómica en la región 13q34 lo que permitió acotar la región mínima de la amplificación en 1.83 Mb la cual se extiende desde el par de bases 111.530.888 hasta el 115.092.802 (versión hg19, UCSC).

Una vez definida la región mínima se procedió al estudio de los genes contenidos en ella con el objetivo de identificar el potencial gen (o genes) diana de la amplificación 13q34. Para ello, se utilizó el buscador *UCSC Genome Browser* que, en el momento del estudio, describía 22 genes incluidos en las 1.83 Mb y 7 marcos de lectura abiertos (ORF, *open reading frame*) en los que no existía gen asociado o, si lo había, era de función hipotética. Actualmente en el mismo buscador se identifican 4 genes adicionales a los 22 previamente comentados. En la Tabla 1 se muestran los genes y los ORFs presentes en la región mínima de amplificación. En negrita se señalan los genes seleccionados para el estudio y, con un asterisco, aquellos que no estaban descritos en la búsqueda inicial.

Tabla 1. Lista de genes localizados en la región mínima de amplificación en la región 13q34.

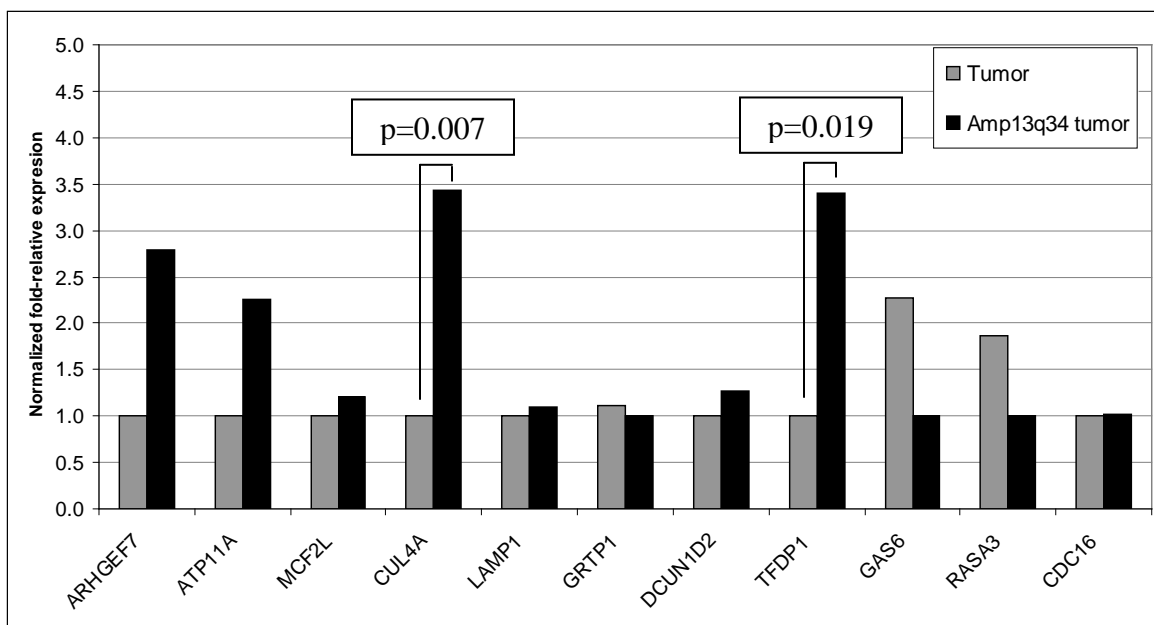
Nombre	Secuencia de referencia	Localización cromosómica (inicio-final pb)	Descripción	Información adicional
<i>ANKRD10</i>	NM_017664.2	111530888-111567416	<i>ankyrin repeat domain 10</i>	
<i>ARHGEF7</i>	NM_145735.2	111767624-111947542	<i>Rho guanine nucleotide exchange factor (GEF) 7</i>	Rho GTPasa que desempeña un papel fundamental en numerosos procesos celulares mediados por receptores acoplados a proteína G. Involucrado en migración celular, anclaje y propagación celular
<i>* TEX29</i>	NM_152324.1	111973015-111996593	<i>testis expressed 29</i>	
<i>SOX1</i>	NM_005986.2	112721913-112726020	<i>SRY (sex determining region Y)-box 1</i>	Factor de transcripción involucrado en la regulación del desarrollo embrional y en la determinación del destino celular
<i>* SPACA7</i>	NM_145248.4	113030669-113089001	<i>sperm acrosome associated 7</i>	
<i>TUBGCP3</i>	NM_006322.4	113139328-113242481	<i>tubulin, gamma complex associated protein 3</i>	Codifica para una proteína necesario para la nucleación de los microtúbulos en el centrosoma
<i>C13orf35</i>	NM_207440.1	113301358-113338811	<i>chromosome 13 open reading frame 35</i>	
<i>ATP11A</i>	NM_032189.3	113344643-113541480	<i>ATPase, class VI, type 11A</i>	ATPasa integral de membrana. Probablemente medie el transporte de iones a través de la membrana celular
<i>MCF2L</i>	NM_001112732.2	113622757-113752862	<i>MCF.2 cell line derived transforming sequence-like</i>	Factor de intercambio de nucleótidos de guanina
<i>F7</i>	NM_000131.4	113760105-113774994	<i>coagulation factor VII (serum prothrombin conversion accelerator)</i>	Factor de coagulación. Defectos en este gen causan coagulopatías.
<i>F10</i>	NM_000504.3	113777113-113803841	<i>coagulation factor X</i>	Factor de coagulación. Mutaciones de este gen producen deficiencias del factor X, enfermedad hemorrágica de severidad variable
<i>PROZ</i>	NM_003891.2	113812968-113826694	<i>protein Z, vitamin K-dependent plasma glycoprotein</i>	La proteína codificada está involucrada en la regulación de la coagulación sanguínea.
<i>PCID2</i>	NM_018386.3	113831925-113863029	<i>PCI domain containing 2</i>	Interviene en la diferenciación de los linfocitos B
<i>CUL4A</i>	NM_001008895.1	113863931-113919391	<i>cullin 4A</i>	Componente del complejo multifuncional ubiquitin-protein ligase E3
<i>LAMP1</i>	NM_005561.3	113951469-113977741	<i>lysosomal-associated membrane protein 1</i>	Glicoproteína de membrana. Puede desempeñar un papel en metástasis de células tumorales
<i>GRTP1</i>	NM_024719.2	113978506-114018463	<i>growth hormone regulated TBC protein 1</i>	Puede actuar como proteína activadora de GTPasa para la familia de proteínas Rab

Tabla 1. (Continuación).

<i>ADPRHL1</i>	NM_138430.3	114076586-114107839	<i>ADP-ribosylhydrolase like 1</i>	La ribosulación dependiente de ADP es una modificación post-traslacional reversible usada para regular funciones proteicas
<i>DCUN1D2</i>	NM_001014283.1	114110134-114145023	<i>DCN1, defective in cullin neddylation 1, domain containing 2 (S. cerevisiae)</i>	Puede estar involucrado en la nedilación de culinas componentes de los complejos multifuncionales ubiquitin-protein ligase E3 de tipo SCF
<i>TMCO3</i>	NM_017905.4	114145308-114204542	<i>transmembrane and coiled-coil domains 3</i>	
<i>TFDP1</i>	NM_007111.4	114239056-114295786	<i>transcription factor Dp-1</i>	Factor de transcripción que heterodimeriza con las proteínas E2F para aumentar su actividad de unión al DNA y promover la transcripción de genes diana de E2F
<i>ATP4B</i>	NM_000705.3	114303123-114312501	<i>ATPase, H+/K+ exchanging, beta polypeptide</i>	Gen que codifica para para subunidad beta de las ATPasas gástricas H+ y K+
<i>GRK1</i>	NM_002929.2	114321597-114438636	<i>G protein-coupled receptor kinase 1</i>	Proteína quinasa (Ser/Thr) que fosforila la rodopsina e inicia su desactivación. Defectos en este gen causan la enfermedad de Oguchi tipo 2
* <i>LINC00552</i>	NR_028064.1	114451484-114454062	<i>long intergenic non-protein coding RNA 552</i>	
<i>GAS6</i>	NM_000820.2	114523524-114567046	<i>growth arrest-specific 6</i>	Protein que contiene acido gamma-carboxiglutamico (Gla) involucrada en la estimulación de la proliferación celular. Puede desempeñar un papel en trombosis.
* <i>LINC00452</i>	XR.159067.1	114586610-114626485	<i>long intergenic non-protein coding RNA 452</i>	
<i>RASA3</i>	NM_007368.2	114747195-114898095	<i>RAS p21 protein activator 3</i>	Miembro de la familia GAP1 de proteínas activadoras de GTPasa. El product del gen estimula la actividad GTPasa de la proteína normal Ras p21 pero no la de su homólogo oncogénico. Actúa como supresor de la función de Ras, la proteína aumenta la actividad GTPasa intrínseca de las proteínas Ras generando formas inactivas GDP de Ras, por lo tanto, permitiendo el control de la proliferación celular y la diferenciación
<i>CDC16</i>	NM_003903.3	115000362-115038150	<i>cell division cycle 16 homolog (S. cerevisiae)</i>	Component del complejo proteico APC, un sistema de degradación de ciclina que regula la salida de la mitosis
<i>UPF3A</i>	NM_080687.2	115047078-115071281	<i>UPF3 regulator of nonsense transcripts homolog A (yeast)</i>	Componente del complejo multiproteico de post-splicing involucrado tanto en la exportación nuclear como en el seguimiento del mRNA
* <i>CHAMP1</i>	NM_032436.2	115079965-115092802	<i>chromosome alignment maintaining phosphoprotein 1</i>	

Para la caracterización detallada del amplicón 13q34 y la elección de genes candidatos (potenciales oncogenes diana de la amplificación) se procedió al estudio de los niveles de expresión de los genes contenidos en la región mínima de amplificación mediante qRT-PCR. Se restringió el análisis a 11 genes (*ARHGEF7*, *ATP11A*, *MCF2L*, *CUL4A*, *LAMP1*, *GRTF1*, *DCUN1D2*, *TFDP1*, *GAS6*, *RASA3* y *CDC16*) de los 22 inicialmente descritos debido a que, finalizados los estudios de CGH y FISH, la disponibilidad del material tumoral fue limitada. Además, éste era parafinado por lo que el rendimiento de la extracción de RNA era reducida. El criterio de selección empleado fue que, conforme con la bibliografía los genes pudieran tener relación con el proceso tumoral o la transformación celular.

Para determinar el gen o genes en los que la presencia de amplificación se asociaba con una mayor expresión se evaluaron los niveles de expresión en dos tipos de muestras: tumores sin ningún tipo de aberración genómica en la región 13q34 (n=13) y tumores con amplificación en 13q34 (6 muestras tumorales y la línea celular de mama MDA-MB-157). Cuatro genes, *ARHGEF7*, *ATP11A*, *CUL4A* y *TFDP1*, presentaron mayores niveles de expresión en los tumores con amplificación que en los no amplificados, sin embargo las diferencias fueron estadísticamente significativas únicamente en el caso de *CUL4A* ( $p=0.007$ ) y *TFDP1* ( $p=0.019$ ) (Figura 1). Con estos datos se decidió continuar el estudio con la ubiquitina ligasa *CUL4A* y el factor de transcripción *TFDP1* como posibles genes diana de la amplificación en 13q34.



**Figura 1. Niveles de expresión relativa de 11 genes localizados en la región mínima de amplificación.** Se analizaron dos grupos de muestras: tejido tumoral de mama sin alteración genómica en 13q34 (en gris) y tejido tumoral con amplificación en 13q34 (negro). La expresión de los genes candidatos se evaluó mediante PCR cuantitativa a tiempo real y se normalizó con la expresión de un gen endógeno (*β-actina*, *ACTB*). En la parte superior de la gráfica se indican los valores de p de aquellos genes que resultaron tener diferencias estadísticamente significativas al comparar la expresión entre los dos grupos de muestras para cada uno de los genes. El análisis se realizó mediante el test U de Mann Whitney (nivel de significación  $p < 0.05$ ).

## **1.2. Correlación entre la presencia de amplificación en 13q34 y los niveles de expresión proteica de los genes candidatos *CUL4A* y *TFDP1***

Para el estudio de la expresión proteica de los genes candidatos *CUL4A* y *TFDP1* y su correlación con la amplificación 13q34 se llevó a cabo un análisis inmunohistoquímico en dos TMAs de tumores familiares y tres TMAs de tumores esporádicos (156 y 258 tumores, respectivamente) previamente analizados por FISH. El 75% de los tumores con amplificación en 13q34 (9/12) mostraron una tinción intensa para *CUL4A*, comparado con el 34.3% de los tumores sin amplificación que sobreexpresan *CUL4A* (Figura 2A-C y Tabla 2A). Por otra parte, el 92.3% de los tumores con la amplificación en 13q34 (12/13) presentan sobreexpresión de *TFDP1*, mientras que un 51.9% de los tumores sin amplificación sobreexpresan *TFDP1* (Figura 2D-F y Tabla 2B). Tanto para *CUL4A* como para *TFDP1* las diferencias de expresión entre tumores con amplificación y sin amplificación fueron significativas (*CUL4A*,  $p=0.01$ ; *TFDP1*,  $p=0.004$ ). Estos hallazgos demostrarían que un número elevado de copias de 13q34 está significativamente asociado con una elevada expresión de ambos genes, no solamente a nivel de mRNA sino también en cuanto a niveles de proteína. Sin embargo, teniendo en cuenta que hay casos sin amplificación que muestran sobreexpresión, la amplificación en 13q34 no sería el único mecanismo para sobreexpresar *CUL4A* y *TFDP1*.

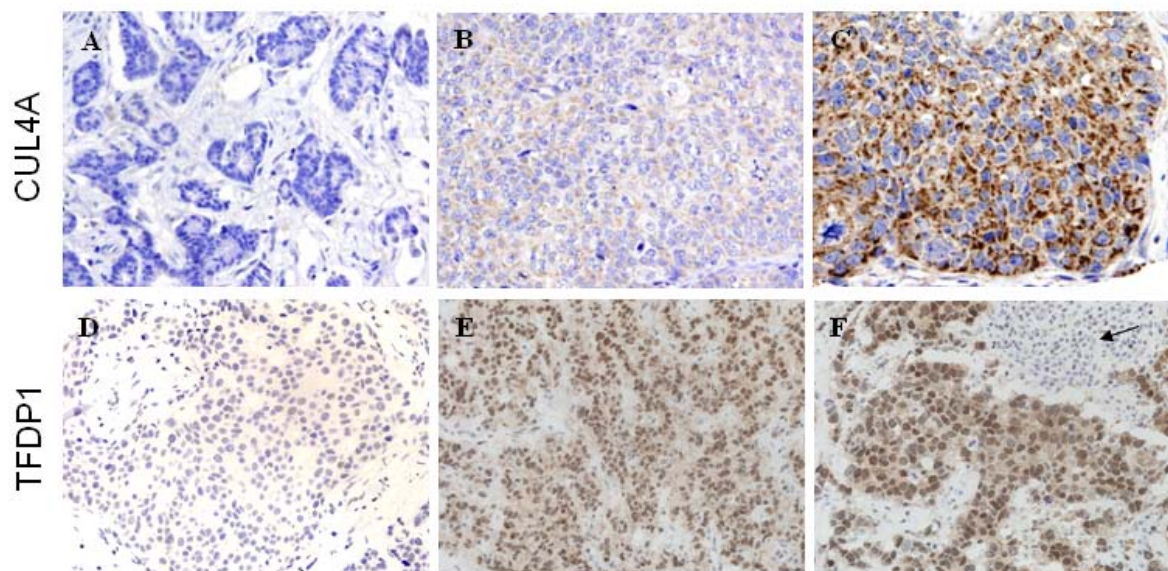


Figura 2. Tinción inmunohistoquímica de CUL4A y TFDP1 en tumores con y sin amplificación en la región 13q34. (A) Ausencia de tinción para CUL4A en un tumor sin amplificación. (B) Tinción moderada de CUL4A en un tumor no amplificado. (C) Tinción intensa de CUL4A en un tumor con la amplificación 13q34. (D) Expresión negativa de TFDP1 en un tumor sin la amplificación 13q34. (E y F) Tinción intensa de la expresión de TFDP1 en tumores con la amplificación 13q34. La flecha (F) señala la ausencia de expresión en un infiltrado linfocitario comparado con la tinción intensa de las células de mama tumorales.

Tabla 2. Correlación entre la presencia/ausencia del amplicón 13q34 con la expresión proteica de CUL4A y TFDP1.

A	Expresión de CUL4A					
	CUL4A(a)			CUL4A(b)		
	Negativa	Postiva		Negativa	Media	Postiva
13q34						
No amp	155 (65.7)	81 (34.3)		4 (1.7)	151 (64.0)	81 (34.3)
Amp	3 (25.0)	9 (75.0)		0 (0)	3 (25.0)	9 (75.0)
p-valor	p= 0.010			p= 0.017		

B	Expresión de TFDP1					
	TFDP1(c)			TFDP1(d)		
	Negativa	Postiva		Negativa	Positiva 1	Postiva 2
13q34						
No amp	115 (48.1)	124 (51.9)		115 (48.1)	76 (31.8)	48 (20.1)
Amp	1 (7.7)	12 (92.3)		1 (7.7)	2 (15.4)	10 (76.9)
p-valor	p= 0.004			p< 0.001		

Cada casilla indica el número de muestras con tinción negativa o positiva para CUL4A o TFDP1 en las series y, entre paréntesis, el porcentaje al que correspondieron. Los números hacen referencia a los casos que fueron valorables (de los 414 incluidos en los TMAs). (A) Expresión de CUL4A: <sup>(a)</sup> clasificación de la expresión de CUL4A en dos categorías: tinción negativa y tinción positiva o intensa. <sup>(b)</sup> tres categorías para la expresión de CUL4A: tinción negativa, media y positiva o intensa. (B) Expresión de TFDP1: <sup>(c)</sup> clasificación de la expresión de TFDP1 en dos categorías: negativa (<25%) y positiva o intensa (>25%); <sup>(d)</sup> tres categorías para la



expresión de TFDP1: negativa, <25% de células teñidas; positiva 1, entre 25-60% de células teñidas; positiva 2, >60% de células teñidas. Valores de p obtenidos al aplicar el test Chi cuadrado de Pearson. Amp: amplificación.

### **1.3. Asociación de la amplificación 13q14 y/o sobreexpresión de los genes candidatos *CUL4A* y *TFDP1* con diferentes marcadores inmunohistopatológicos.**

Para determinar la posible asociación entre la presencia de amplificación en 13q34 y/o sobreexpresión de los genes candidatos y otras características inmunohistopatológicas se contó con los datos de estudios previos del grupo en los que se valoraron diferentes anticuerpos en parte de los tumores de mama familiares y esporádicos indicados en el apartado anterior (260 de los 414 tumores) (Honrado et al, 2005; Palacios et al., 2005).

Observamos que los tumores con la amplificación 13q34 se caracterizaban por ser de alto grado histológico, carecer de expresión de ER, PR, CCND1, RB, p16, y CK8; asimismo presentaban sobreexpresión de Ki67, EGFR, P-Caderina, CCNE, CCNB1, SKP2 y CK5 (Tabla 3). La mayor parte de estos marcadores se asocian con los tumores de mama de fenotipo basal, lo que confirmaría datos previos del grupo que indicaban que la amplificación en 13q34 sería característica de este grupo de tumores (Melchor et al., 2008).

Los tumores que sobreexpresaron CUL4A presentaron alto grado histológico, ausencia de expresión de PR y BCL2, y una mayor expresión de EGFR, P-Cadherin, CCNB1, SKP2 y CK5 comparado con aquellos que no sobreexpresaban CUL4A. Los tumores que sobreexpresaron TFDP1 se asociaron con altos niveles de expresión de CCNE, CCNB1 y p16. No encontramos una asociación significativa entre los niveles de expresión proteica de CUL4A y TFDP1 en el total de las muestras de cáncer de mama estudiadas (datos no mostrados). Los resultados de este estudio de asociación indicarían que la sobreexpresión de los genes CUL4A y TFDP1 aunque estaría correlacionada con la presencia de la amplificación 13q34, no sería exclusiva de los tumores de fenotipo basal, si bien continuaría relacionándose con alta agresividad en cáncer de mama.

Tabla 3. Asociación presencia de la amplificación 13q34 o la expresión proteica de CUL4A o TFDP1 con otros marcadores inmunohistopatológicos.

Características clínicas e IHQ	13q34 Amplificación			expresión de CUL4A			expresión de TFDP1		
	Ausencia	Presencia	P	Negativo	Positivo	P	Negativo	Positivo	P
<b>Grade</b>									
1	42 (32.1)	0		26 (40.6)	10 (19.2)		12 (32.4)	27 (33.3)	
2	40 (30.5)	0	<b>0.002*</b>	19 (29.7)	13 (25.0)	<b>0.010*</b>	11 (29.7)	22 (27.2)	NS*
3	49 (37.4)	8 (100)		19 (29.7)	29 (55.8)		14 (37.8)	32 (39.5)	
<b>ER</b>									
Negativo	56 (35.4)	8 (88.9)	<b>0.002</b>	30 (36.6)	29 (48.3)	NS	24 (46.2)	35 (38.0)	NS
Positivo	102 (64.6)	1 (11.1)		52 (63.4)	31 (51.7)		28 (53.8)	57 (62.0)	
<b>PR</b>									
Negativo	68 (47.2)	8 (88.9)	<b>0.018</b>	30 (43.5)	37 (62.7)	<b>0.034</b>	20 (48.8)	47 (52.3)	NS
Positivo	76 (52.8)	1 (11.1)		39 (56.5)	22 (37.3)		21 (51.2)	42 (47.7)	
<b>BCL2</b>									
Negativo	82 (56.9)	8 (88.9)	0.082	37 (53.6)	42 (71.2)	<b>0.047</b>	29 (70.7)	52 (58.4)	NS
Positivo	62 (43.1)	1 (11.1)		32 (46.4)	17 (28.8)		12 (29.3)	37 (41.6)	
<b>Ki-67</b>									
0-5%	68 (47.2)	1 (11.1)		35 (50.7)	22 (37.3)		22 (53.7)	35 (39.3)	
6-25%	56 (38.9)	1 (11.1)	<b>&lt;0.001*</b>	24 (34.8)	20 (33.9)	NS*	13 (31.7)	32 (36.0)	NS*
>25%	20 (13.9)	7 (77.8)		10 (14.5)	17 (28.8)		6 (14.6)	22 (24.7)	
<b>EGFR</b>									
Negativo	181 (90.0)	4 (40.0)	<b>&lt;0.001</b>	122 (91.7)	57 (80.3)	<b>0.024</b>	94 (91.3)	89 (85.6)	NS
Positivo	20 (10.0)	6 (60.0)		11 (8.3)	14 (19.7)		9 (8.7)	15 (14.4)	
<b>Cadherin P</b>									
Negativo	128 (92.1)	3 (33.3)	<b>&lt;0.001</b>	63 (95.5)	46 (79.3)	<b>0.011</b>	37 (94.9)	74 (86.0)	NS
Positivo	11 (7.9)	6 (66.6)		3 (4.5)	12 (20.7)		2 (5.1)	12 (14.0)	
<b>G-Catenin</b>									
Negativo	106 (79.1)	4 (44.4)	<b>0.031</b>	59 (86.8)	43 (75.4)	NS	36 (90.0)	69 (78.4)	NS
Positivo	28 (20.9)	5 (55.5)		9 (13.2)	14 (24.6)		4 (10.0)	19 (21.6)	
<b>Cyclin D1</b>									
Negativo	67 (47.2)	8 (88.9)	<b>0.018</b>	32 (47.1)	27 (46.6)	NS	17 (42.5)	42 (47.7)	NS
Positivo	75 (52.8)	1 (11.1)		36 (52.9)	31 (53.4)		23 (57.5)	46 (52.3)	
<b>Cyclin E</b>									
Negativo	103 (72.5)	2 (22.2)	<b>0.004</b>	50 (73.5)	34 (58.6)	0.09	32 (80.0)	53 (60.2)	<b>0.043</b>
Positivo	39 (27.5)	7 (77.8)		18 (26.5)	24 (41.4)		8 (20.0)	35 (39.8)	
<b>Cyclin B1</b>									
Negativo	111 (80.4)	4 (44.4)	<b>0.024</b>	57 (86.4)	40 (70.2)	<b>0.045</b>	37 (92.5)	61 (72.6)	<b>0.01</b>
Positivo	27 (19.6)	5 (55.6)		9 (13.6)	17 (29.8)		3 (7.5)	23 (27.4)	
<b>RB</b>									
Negativo	33 (23.9)	6 (66.7)	<b>0.011</b>	12 (18.2)	14 (24.1)	NS	11 (27.5)	15 (17.4)	NS
Positivo	105 (76.1)	3 (33.3)		54 (81.8)	44 (75.9)		29 (72.5)	71 (82.6)	

Tabla 3. (Continuación).

E2F6									
Negativo	89 (64.5)	4 (44.4)	NS	39 (59.1)	38 (66.7)	NS	30 (75.0)	47 (56.0)	0.049
Positivo	49 (35.5)	5 (55.6)		27 (40.9)	19 (33.3)		10 (25.0)	37 (44.0)	
P16									
Negativo	53 (39.0)	7 (77.8)	0.033	24 (36.9)	30 (51.7)	NS	23 (59.0)	31 (36.0)	0.02
Positivo	83 (61.0)	2 (22.2)		41 (63.1)	28 (48.3)		16 (41.0)	55 (64.0)	
SKP2									
Negativo	66 (46.8)	1 (11.1)	0.043	40 (58.8)	22 (37.9)	0.021	24 (60.0)	40 (46.0)	NS
Positivo	75 (53.2)	8 (88.9)		28 (41.2)	36 (62.1)		16 (40.0)	47 (54.0)	
Survivin									
Negativo	97 (70.8)	1 (11.1)	0.001	49 (72.1)	35 (61.4)	NS	30 (75.0)	57 (64.8)	NS
Positivo	40 (29.2)	8 (88.9)		19 (27.9)	22 (38.6)		10 (25.0)	31 (35.2)	
CK5									
Negativo	133 (86.4)	3 (33.3)	0.001	74 (90.2)	43 (72.9)	0.011	42 (82.4)	77 (82.8)	NS
Positivo	21 (13.6)	6 (66.6)		8 (9.8)	16 (27.1)		9 (17.6)	16 (17.2)	
CK8									
Negativo	28 (19.9)	7 (77.8)	0.001	12 (17.6)	17 (29.3)	NS	7 (17.5)	24 (27.0)	NS
Positivo	113 (80.1)	2 (22.2)		56 (82.4)	41 (70.7)		33 (82.5)	65 (73.0)	
Vimentin									
Negativo	109 (79.0)	3 (33.3)	0.006	53 (77.9)	41 (70.7)	NS	32 (80.0)	63 (72.4)	NS
Positivo	29 (21.0)	6 (66.6)		15 (22.1)	17 (29.3)		8 (20.0)	24 (27.6)	

ER = Receptor de estrógeno; PR = Receptor de progesterona; CK = Citoqueratina. RB = Retinoblastoma.

Se presentan aquellos marcadores inmunohistopatológicos que resultaron estadísticamente significativos en al menos una de las comparaciones entre grupos tumorales. Se muestran los valores de  $p \leq 0.10$  y se señalan en negrita aquéllos que fueron estadísticamente significativos ( $p \leq 0.05$ ). NS= no significativo. Los valores de p se calcularon mediante la prueba exacta de Fisher, excepto los correspondientes al análisis del grado histológico y de Ki-67 que se realizaron mediante una Chi-cuadrado de Pearson (\*). Se analizaron otros marcadores inmunohistopatológicos (como HER2) pero no se obtuvieron resultados significativos.

#### 1.4. Justificación de la elección de *CUL4A* para su caracterización funcional

Aunque no se puede descartar el posible papel de otros genes localizados en la región mínima amplificada, no incluidos en nuestro análisis por limitaciones del material disponible o que no llegaron a alcanzar significación estadística en este estudio, los resultados obtenidos en los experimentos de RT-qPCR e inmunohistoquímica apuntarían a *CUL4A* y *TFDP1* como genes candidatos a ser diana de la amplificación 13q34. Encontramos una correlación positiva y significativa entre la presencia de la amplificación y los niveles de expresión génica y proteica de *CUL4A* y *TFDP1*, es decir, el número de copias determinaría en gran medida los niveles de expresión de ambos genes, independientemente de la existencia de otros mecanismos reguladores de la expresión de los mismos. Además, el hecho de que los elevados niveles de expresión de proteína de *CUL4A* y *TFDP1* se asocien con diferentes marcadores inmunohistopatológicos relacionados con malignidad y peor pronóstico de la enfermedad enfatizarían el interés de ambos genes desde el punto de vista clínico.

A pesar del interés de ambos genes candidatos, debido a la limitación temporal de un proyecto de tesis y al mayor número de evidencias previas vinculando *CUL4A* con el cáncer de mama, se eligió este gen para continuar con su caracterización funcional en modelos *in vitro* e *in vivo* y el estudio de su posible papel oncogénico en dicha neoplasia.

## 2. Definición del papel oncogénico del gen candidato *CUL4A*

### 2.1. Selección de modelos celulares

Para la definición del papel oncogénico del gen candidato *CUL4A* en primer lugar se realizó una selección de los modelos celulares que mejor se ajustaban a las características observadas en los tumores primarios. Es decir, presencia de amplificación en la región cromosómica 13q34 y alta expresión de *CUL4A*, o alta expresión del gen en ausencia de amplificación (representando a los tumores primarios que sobreexpresan *CUL4A* por mecanismos distintos de la amplificación) y asociación con el fenotipo basal. Para llevar a cabo esta selección se partió de un panel de 13 líneas celulares de cáncer de mama (HCC1937, MDA-MB-436, UACC3199, MDA-MB-157, HCC1187, MFM223, HCC1143, SKBR3, COLO824, Hs578T, MCF7, MDA-MB-231 y T47D). Además se incluyeron 3 líneas celulares de mama inmortalizadas pero no transformadas (184B5, HBL100, MCF10A) (Tabla 1 del apartado de Material).

El número de copias de la región 13q34 en las líneas celulares se determinó mediante datos de CGH procedentes de trabajos previos del grupo o consultando diferentes bases de datos públicas. El tipo de cáncer de mama del que procedían las líneas celulares se obtuvo de la literatura o de la ficha técnica del proveedor (Apartado de Material, Tabla 1). La caracterización de la expresión de *CUL4A* a nivel de RNA mensajero y de proteína en el panel de líneas celulares formó parte del presente trabajo.

#### 2.1.1. Niveles de expresión de mRNA de *CUL4A* en el panel de líneas celulares de mama

En la Figura 3 se muestran los niveles de expresión relativa de *CUL4A* determinados mediante qRT-PCR y normalizados con la expresión del gen endógeno  $\beta$ -actina en el panel de líneas celulares. Las líneas celulares se han representado ordenadas de menor a mayor expresión de *CUL4A*. En general, se observó que las líneas tumorales con más de tres copias en la región de 13q34 (MFM223, HCC1187, MDA-MB-157) presentaron los niveles más altos de expresión de *CUL4A*. Además, se encontró que otras líneas sin alteración en el número de copias de la región

cromosómica (COLO824, MDA-MB-436, HCC1937) también mostraron altos niveles de expresión de *CUL4A*. Las líneas celulares no tumorales (184B5, HBL100) presentaron los niveles más bajos de expresión de *CUL4A* junto con la línea tumoral Hs587T.

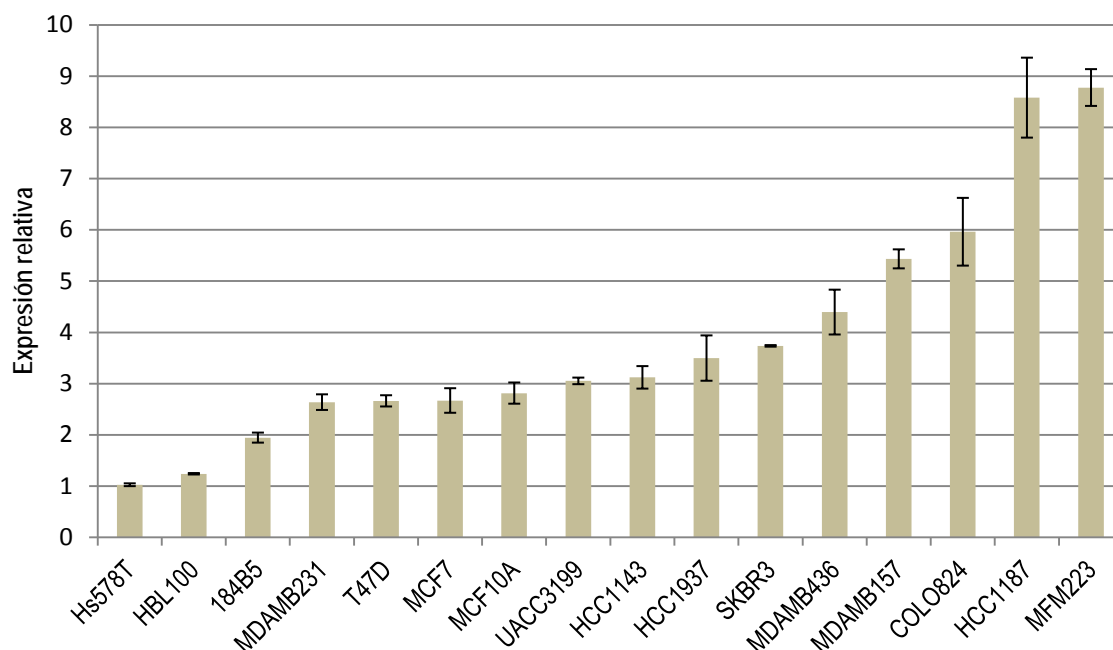


Figura 3. Niveles de expresión relativa de *CUL4A* en el conjunto de líneas celulares de mama tumorales y no tumorales. La expresión de *CUL4A* se evaluó mediante qRT-PCR y se normalizó con la expresión de un gen endógeno ( $\beta$ -actina, *ACTB*). Se muestran las líneas celulares ordenadas de menos a mayor expresión de *CUL4A*. Las barras de error representan la desviación estándar de tres réplicas técnicas.

### 2.1.2. Niveles de expresión proteica de *CUL4A* en el panel de líneas celulares de mama

La determinación de los niveles proteicos de *CUL4A* en el panel de líneas celulares se llevó a cabo mediante WB con anticuerpos específicos anti *CUL4A* y anti  $\beta$ -actina, esta última utilizada como proteína de expresión constitutiva para normalizar entre muestras diferencias debidas a la cantidad de proteína total en las membranas. Las líneas COLO824 y HCC1187 no se incluyeron en este análisis debido a dificultades técnicas en su crecimiento. Los resultados del WB se muestran en la Figura 4. En el inmunoblot de *CUL4A*, usando un anticuerpo específico, detectamos la proteína en forma de doblete. La banda superior se corresponde con la forma nedilada de la proteína *CUL4A*. La nedilación es una modificación post-traducciona que consiste en la unión covalente de la proteína NEDD8 (similar a la ubiquitina) a *CUL4A* para su activación.

En cada línea celular se cuantificó la expresión proteica relativa mediante el programa de procesamiento de imagen digital *ImageJ*. Bajo la imagen de WB de cada línea se indica el valor de la intensidad obtenida para *CUL4A* (suma de la intensidad de ambas bandas) normalizada con la intensidad de la banda del control  $\beta$ -actina. Las imágenes se cortaron y pegaron para organizarlas según los valores normalizados de intensidad de banda crecientes con objeto de facilitar la interpretación de los datos.

Se obtuvieron resultados similares a los observados en la cuantificación de los niveles de expresión relativa de mRNA. Las líneas tumorales MFM223 y MDA-MB-157 con amplificación en 13q34 mostraron niveles altos de proteína de *CUL4A*. También los mostraron las líneas sin amplificación y de tipo familiar HCC1937 y MDA-MB-436. Las líneas celulares no tumorales, 184B5 y HBL100 resultaron expresar niveles bajos de *CUL4A*. No ocurrió lo mismo con la línea MCF10 que, aun siendo no transformada, mostró los niveles más altos de expresión de la proteína.

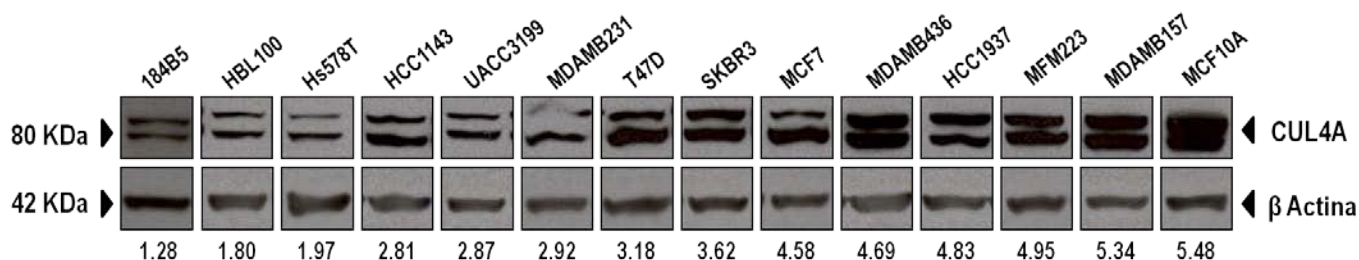


Figura 4. Detección de la expresión de *CUL4A* mediante WB en el conjunto de líneas celulares de mama. La expresión de *CUL4A* se evaluó mediante WB y se normalizó con la expresión de la proteína endógena ( $\beta$ -actina, ACTB). Se muestran las líneas celulares ordenadas de menor a mayor expresión de *CUL4A*. La doble banda en el inmunoblot de *CUL4A* se corresponde con las formas nedilada (superior) y no nedilada (inferior) de la proteína. Los números en la parte inferior de la imagen indican el valor de la intensidad de *CUL4A* (suma de las dos bandas) para cada línea celular normalizado con el valor de la intensidad de  $\beta$ -actina.

Se obtuvo una buena correlación entre los datos derivados de las PCRs cuantitativas y de los WBs ( $\rho$  Spearman= 0.714,  $p=0.004$ ). Esto indicaría que los niveles de mRNA de *CUL4A* serían en gran medida representativos de la abundancia a nivel de proteínas. También sugiere que los mecanismos transcripcionales tendrían un papel importante en la regulación de la expresión de *CUL4A* frente a mecanismos posteriores a la traducción.

En conjunto tanto los resultados de PCR cuantitativa como los de WB en las líneas celulares parecen ajustarse a lo observado en los tumores primarios puesto que la presencia de la amplificación 13q34 determina que los niveles de expresión de *CUL4A* sean elevados. Por otra parte el mayor número de copias de esta región no parece ser un mecanismo exclusivo para la sobreexpresión del gen ya que encontramos líneas celulares sin amplificación con altos niveles de expresión de *CUL4A*.

### **2.1.3. Modelos celulares seleccionados para los ensayos *in vitro***

Los modelos celulares utilizados para los ensayos *in vitro* se seleccionaron basándose en los resultados obtenidos en el estudio de la expresión del gen *CUL4A* a nivel de mRNA y proteínas en el panel de líneas celulares. Además, se tuvo en cuenta la presencia o ausencia de amplificación en la región cromosómica 13q34 y la asociación con el fenotipo basal. Teniendo en cuenta lo previamente indicado se determinó la idoneidad de las líneas MDA-MB-157, HCC-1937 y 184B5 como modelos *in vitro* para determinar el papel oncogénico de *CUL4A*.

La línea MDA-MB-157 derivada de un tumor de mama esporádico de fenotipo basal, presentó amplificación en 13q34 y sobreexpresión de *CUL4A*. Con ello representaría a los tumores primarios de subtipo basal que sobreexpresan *CUL4A* mediante amplificación en 13q34.

La línea HCC1937, derivada del tumor de una paciente portadora de mutación en el gen *BRCA1* y con un número de copias normal en 13q34 (Apartado de Material, Tabla 1) presentó altos niveles de expresión de *CUL4A*. Con dichas características representaría el conjunto de tumores primarios que, sin alteración en 13q34, sobreexpresan el gen mediante otros mecanismos. Además ejemplificaría a los tumores BRCA1 y, en global a los de fenotipo basal, en los que la amplificación es más frecuente.

La línea 184B5 derivada de tejido mamario normal, immortalizada pero no transformada, y sin amplificación en 13q34, presentó bajos niveles relativos de expresión de *CUL4A*. Con ello se consideró un buen modelo para evaluar la inducción de un fenotipo transformado mediante la expresión exógena de *CUL4A*.

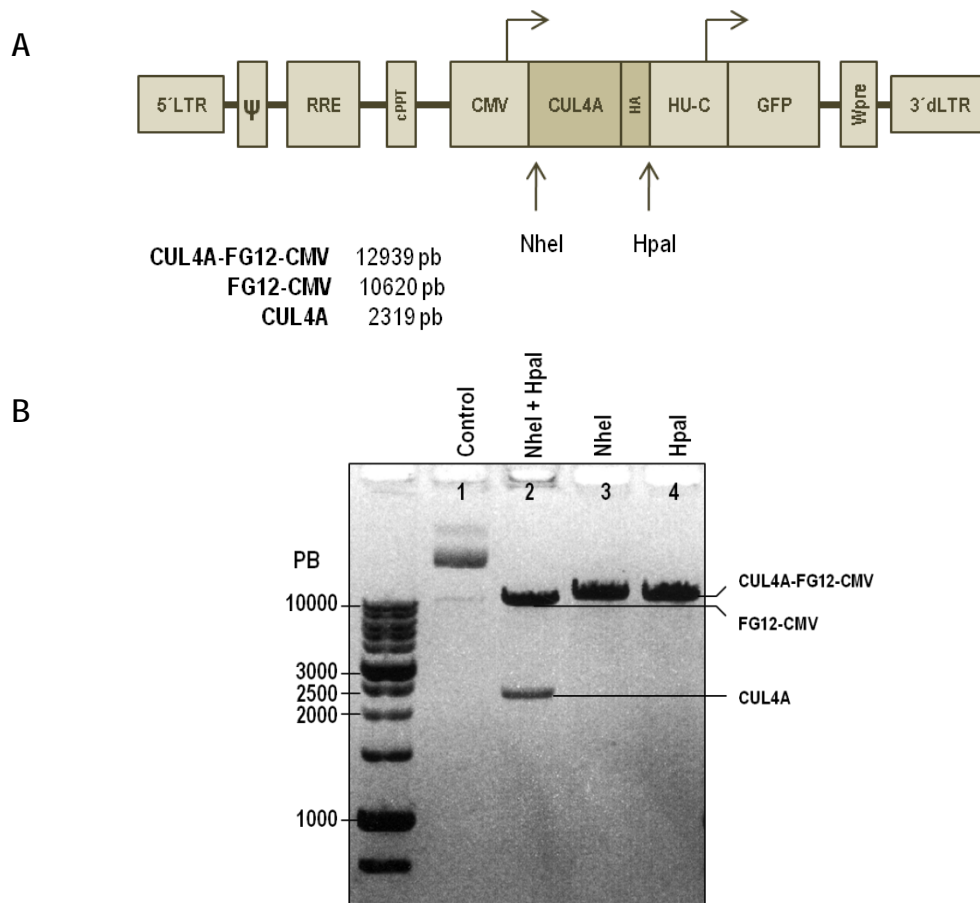


## 2.2. Experimentos *In vitro*:

### 2.2.1. Modificación estable de la expresión de *CUL4A* mediante transducción lentiviral

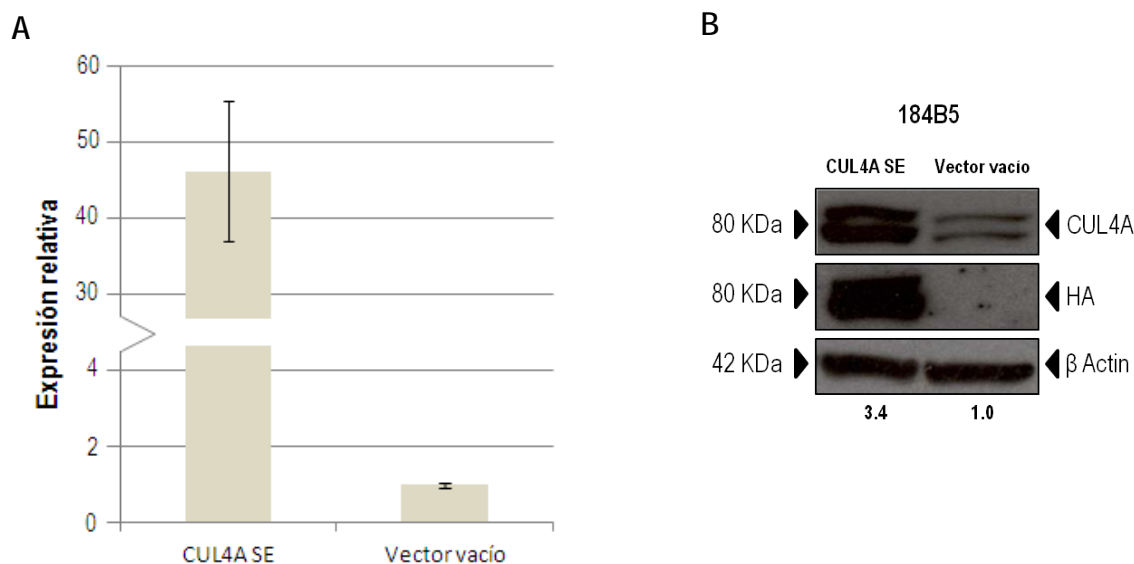
#### ❖ Sobreexpresión

Para llevar a cabo la sobreexpresión estable del gen *CUL4A* en el modelo celular 184B5 se clonó el cDNA del gen en el vector de expresión lentiviral CMV-FG12 en el lugar de clonado múltiple (*multi cloning site*, MCS) usando las enzimas de restricción *NheI* y *HpaI* (Figura 5A). Para determinar que la clonación había sido exitosa se realizó una digestión enzimática de la nueva construcción con las mismas enzimas que se emplearon en la clonación (*NheI* y *HpaI*) lo que, tras análisis en gel de agarosa, produjo el patrón esperado con una banda de unos 2300 pares de bases que se correspondería con el cDNA de *CUL4A* y otra de unos 10000 pares de bases que sería el vector CMV-FG12 (Figura 5B). Asimismo se verificó mediante secuenciación directa que la secuencia del inserto se correspondía con la secuencia correcta del cDNA de *CUL4A*.



**Figura 5. Clonación del cDNA de *CUL4A* en el vector de expresión lentiviral FG12.** (A) Representación del vector FG12-CMV clonado en el que se incluye el cDNA de *CUL4A* junto con el epítipo HA entre las dianas de restricción NheI y HpaI. La descripción del vector se encuentra en la Figura 1 del apartado de Métodos. (B) Comprobación de la clonación mediante digestión enzimática y posterior análisis en gel de agarosa. 1: Vector CUL4A-FG12-CMV sin digerir. 2: Vector CUL4A-FG12-CMV digerido con las enzimas de restricción NheI y HpaI. 3: Vector CUL4A-FG12-CMV linearizado con la enzima NheI. 4: Vector CUL4A-FG12-CMV linearizado con la enzima HpaI. PB, pb: pares de bases.

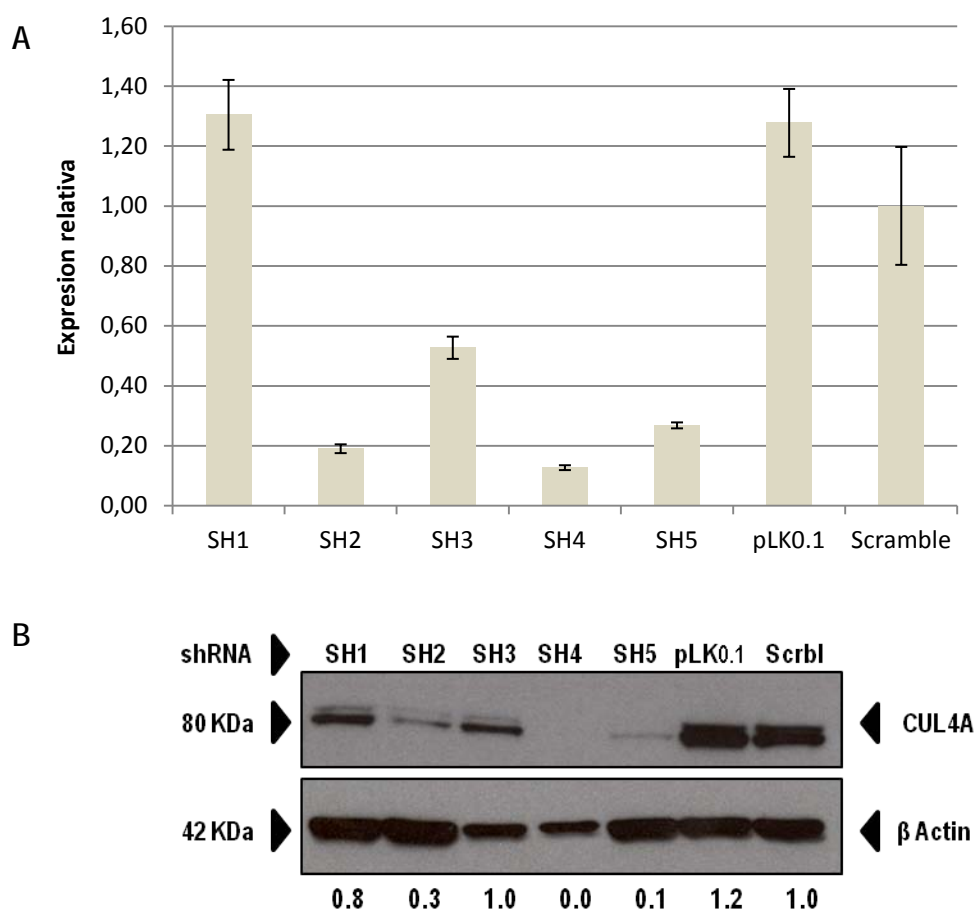
A continuación se comprobó que la construcción CUL4A-CMV-FG12 era funcional. Para ello se infectó la línea 184B5 con virus producidos en la línea 293FT que contenían bien CUL4A-CMV-FG12 o el vector vacío. Tras selección mediante citometría de flujo de células que expresaban la proteína verde, y por lo tanto habían integrado el vector con el inserto o en su caso el vector vacío (ver Material y Métodos), se aisló RNA y proteínas de las mismas. Mediante qRT-PCR y WB se comprobó la existencia de un incremento de los niveles de expresión de CUL4A a nivel de RNA mensajero y de proteína, respectivamente, en las células infectadas con CUL4A-CMV-FG12 comparadas con las células infectadas con el vector vacío (Figura 6). Además, con el anticuerpo anti-HA, que detecta el epítipo añadido tras la secuencia clonada de *CUL4A* se comprobó que el incremento en CUL4A observado en las células infectadas con los virus que contenían el vector CUL4A-CMV-FG12 se debía a la expresión de la proteína exógena (Figura 6 B).



**Figura 6. Incremento de la expresión de *CUL4A* en la línea celular 184B5.** El nivel de sobreexpresión de *CUL4A* inducido por el vector CUL4A-FG12-CMV se determinó mediante RT-qPCR (A) y WB (B). Se representan los datos normalizados (con  $\beta$ -actina) y relativos al control (vector vacío). SE- Sobreexpresión. En la parte inferior del blot se indica el valor de expresión de CUL4A relativo al obtenido en la infección con el Vector vacío y normalizado con la expresión de Beta Actina.

## ❖ Silenciamiento

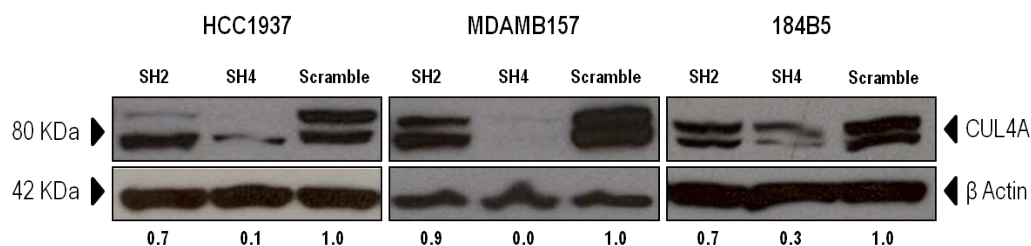
Para la selección de los *short hairping* RNAs (shRNAs) que mejor silenciaban *CUL4A* y que posteriormente se utilizaron para infectar los modelos celulares se produjeron virus que contuvieron cada uno de los cinco shRNAs evaluados integrados en el vector pLK0.1-puro, el vector pLK0.1-puro (vector vacío) y el shRNA *Scramble* (vector pLK0.1puro-*Scramble*) (ver Métodos, apartado X). El vector pLK0.1-puro-*Scramble* (control *Scramble* en adelante) expresa un shRNA que, aunque activa RISC y la maquinaria de RNA interferente, no reconoce ningún gen humano o de ratón. Con los distintos virus generados se infectó la línea celular MCF10A y se valoró el efecto en la expresión de *CUL4A*. La eficiencia del silenciamiento se valoró mediante qPCR (Figura 7A) y WB (Figura 7B).



**Figura 7.** Eficiencia del silenciamiento de *CUL4A* inducido por distintos shRNAs en la línea MCF10A. El nivel de silenciamiento de *CUL4A* producido por cinco shRNAs específicos (SH1-5) se determinó mediante qPCR (A) y WB (B). Los valores de expresión se normalizaron con la expresión de un gen endógeno ( $\beta$ -actina, ACTB). Los datos se representan relativos al valor del control *Scramble*. En la parte inferior del blot se indican los valores de expresión de *CUL4A* relativos al obtenido en la infección con el control *Scramble* y normalizados con la expresión de Beta Actina.

De los 5 shRNAs evaluados, cuatro (SH2-5) produjeron una reducción de los niveles de expresión de *CUL4A* tanto a nivel de mRNA como de proteína aunque en distinta medida (Figura 7, A y B). Seleccionamos los shRNAs 2 y 4 para continuar con los experimentos puesto que fueron los que mejor silenciaron la expresión del gen y no produjeron ningún efecto citotóxico (a diferencia del SH5 que indujo muerte celular). La expresión de *CUL4A* en las células infectadas con el vector vacío y con vector *Scramble* fue similar. Dada la mayor idoneidad de este último se seleccionó como control negativo en los experimentos subsiguientes.

Posteriormente, comprobamos el silenciamiento de *CUL4A* con los shRNAs elegidos en nuestros modelos celulares tumorales HCC1937 y MDA-MB-157 y en la línea inmortalizada pero no transformada 184B5 (Figura 8). Decidimos incluir la línea 184B5 en los experimentos de silenciamiento *in vitro* con el objetivo de valorar el efecto de la disminución de los niveles de *CUL4A* en un modelo no tumoral.



**Figura 8. Eficiencia del silenciamiento de *CUL4A* en los modelos celulares seleccionados.** Se muestran los niveles de expresión de *CUL4A* determinados mediante WB correspondientes a las infecciones de las líneas celulares HCC1937, MDA-MB-157 y 184B5 con dos shRNA específicos (SH2 y SH4) y con el control *Scramble*. Bajo cada carril se indican los valores de expresión de *CUL4A* relativos a los obtenidos en las infecciones con el control *Scramble* y normalizados con la expresión de Beta Actina.

Mediante WB observamos que, dependiendo de la línea celular, el grado de silenciamiento de *CUL4A* inducido en las células infectadas con el shRNA SH2 variaba y que, aunque en las tres líneas celulares los niveles de *CUL4A* eran inferiores a los de las células infectadas con el control *Scramble*, no se llegaba a generar el silenciamiento observado previamente en la línea MCF10A. Sin embargo, aunque también encontramos variación en cuanto al nivel de silenciamiento inducido por el shRNA SH4, los valores de expresión de *CUL4A* en las líneas infectadas con este shRNA eran muy inferiores a los observados en las infecciones correspondientes al control *Scramble*, con una

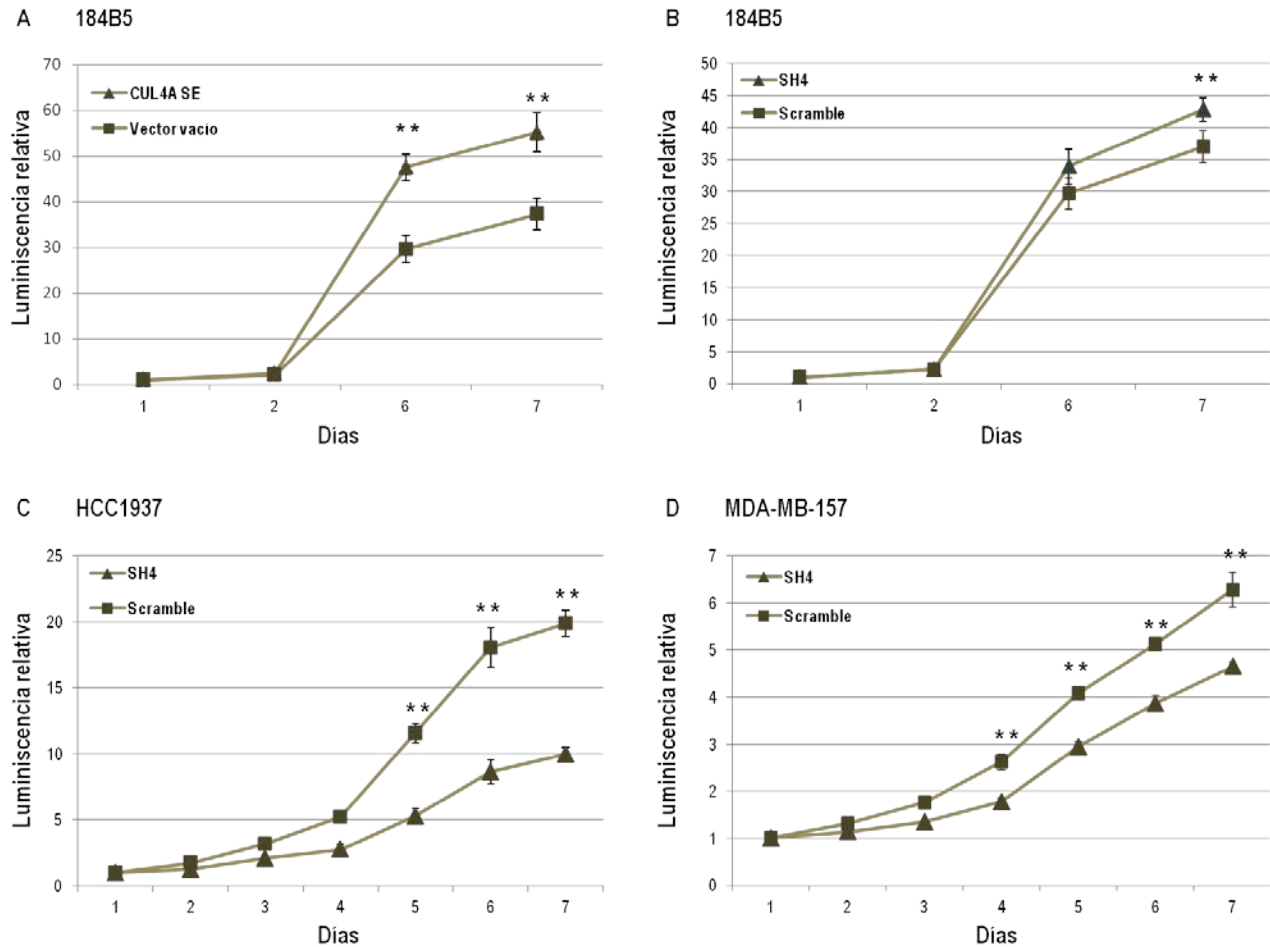
reducción mínima con respecto a este último de al menos un 70%. Con estos resultados se seleccionó el shRNA SH4 para los experimentos subsiguientes.

### 2.2.2. Efectos de la modificación de los niveles de expresión de *CUL4A* en la viabilidad celular, proliferación y apoptosis

#### ❖ Análisis de la viabilidad y proliferación celular

Para determinar si la modificación de los niveles de *CUL4A* afecta a la tasa de proliferación se realizó un ensayo luminiscente de viabilidad celular a lo largo de una semana con los distintos modelos celulares. Se evaluó la existencia de diferencias entre la línea 184B5 con expresión exógena de *CUL4A* y las correspondientes células control (184B5 infectada con el vector vacío FG12) así como entre las líneas HCC1937 y MDA-MB-157 con silenciamiento de *CUL4A* y sus respectivos controles (líneas parentales infectadas con el shRNA *Scramble*). Además se analizó si el silenciamiento de *CUL4A* en la línea 184B5 (inmortalizada no transformada) tenía algún efecto.

La expresión exógena de *CUL4A* en la línea 184B5 produjo un incremento en la proliferación celular con respecto a las células control (Figura 9A). Estas diferencias supusieron un aumento significativo en la viabilidad celular del 48% en relación con las células control a día 7 tras la siembra inicial. Respecto a los modelos de silenciamiento, la línea no transformada 184B5 infectada con los shRNAs lentivirales específicos de *CUL4A* presentó un comportamiento similar al de su correspondiente línea control (Figura 9B). No se observó disminución de la viabilidad celular sino un pequeño incremento significativo del 16% en este parámetro en la fase final del experimento. (Figura 9B). Sin embargo, el silenciamiento de *CUL4A* en las líneas tumorales HCC1937 y MDA-MB-157 resultó en una disminución de la proliferación celular (Figura 9 C y D). A lo largo del experimento el número de células viables en ambas líneas silenciadas se vio significativamente reducido con respecto al observado en las líneas control. A día 7 tras el plaqueo inicial las células HCC1937 y MDA-MB-157 modificadas presentaron una disminución en la viabilidad celular del 50% y 26% respectivamente en relación con sus controles.



**Figura 9.** La modulación de la expresión de *CUL4A* en células epiteliales de mama modifica la proliferación celular. Curvas de crecimiento de las líneas modificadas y sus respectivos controles determinadas mediante un ensayo luminiscente de viabilidad celular. Las líneas modificadas y control se plaquearon a igual densidad y cada 24h a lo largo de 7 días se realizó un ensayo Cell Titer Glo, obteniéndose un valor de luminiscencia proporcional al número de células viables en el cultivo. En el eje Y se representan los valores de luminiscencia relativos a los obtenidos a día 1. Las gráficas corresponden a un experimento representativo de tres realizados, cada uno de ellos con 6 réplicas experimentales. Cada punto de las curvas corresponde al valor medio y desviación estándar de las seis réplicas experimentales. Se muestran los resultados correspondientes a la línea 184B5 con sobreexpresión (SE) de *CUL4A* (A) y de las líneas 184B5 (B), HCC1937 (C) y MDA-MB-157 (D) con silenciamiento del gen (SH4). El análisis estadístico se llevó a cabo mediante la prueba t de Student; \* $p < 0.05$  con respecto a control; \*\* $p < 0.01$  con respecto a control.

De acuerdo con estos resultados el incremento de expresión de *CUL4A* induciría un aumento de la proliferación celular. Por el contrario, el silenciamiento de *CUL4A* conllevaría una inhibición del crecimiento celular. Es importante reseñar que esta disminución de la tasa de proliferación se produciría de manera específica en los modelos tumorales que de base presentan altos niveles de la proteína ya que en la línea celular inmortalizada pero no transformada 184B5 y con bajos niveles de

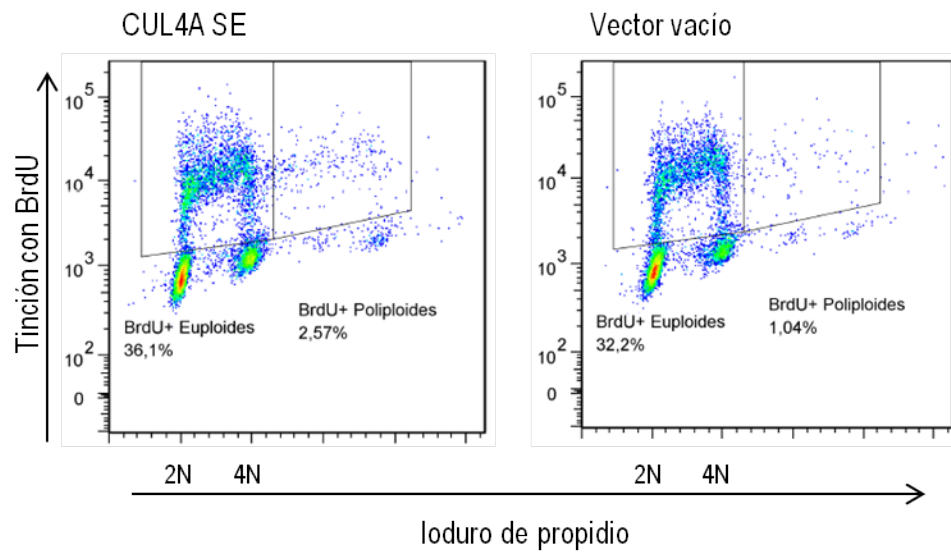
expresión de *CUL4A* el silenciamiento del gen no indujo disminución de la proliferación. El pequeño incremento en viabilidad celular observado en esta línea al silenciar *CUL4A* no se consideró relevante. No obstante, este modelo se incluyó en otro tipo de ensayos (como los de formación de colonias) para caracterizar los posibles efectos del silenciamiento del gen en células no transformadas.

#### ❖ **Análisis de la proliferación celular mediante incorporación de BrdU**

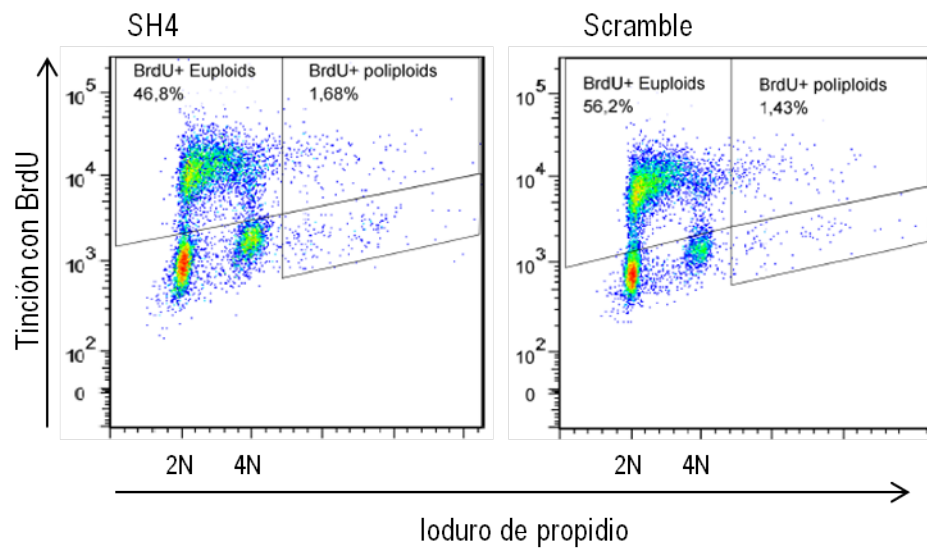
Para estudiar en detalle el efecto de la modificación de los niveles de *CUL4A* en la proliferación celular, se analizó la tasa de incorporación de BrdU en la fase de síntesis del ciclo celular de los modelos de sobreexpresión y silenciamiento del gen así como en sus respectivos controles. En la Figura 10 se muestran los resultados de un experimento representativo de tres experimentos realizados. Los gráficos corresponden a los perfiles de la tinción del BrdU incorporado por las células de los distintos modelos. En cada línea celular se señalan tanto las células euploides como las poliploides que mostraron tinción positiva para BrdU.

En la Figura 11 se expone mediante representación en diagrama de barras el porcentaje de células que fueron positivas para la tinción con BrdU en los modelos celulares y en sus controles. Cada barra representa la media y la desviación estándar de los tres experimentos realizados con cada línea celular (modificada o control) e ilustra las contribuciones parciales de células euploides (en color claro) y células poliploides (en color oscuro) al cómputo total de incorporación de BrdU.

## A 184B5



## B HCC1937





### C MDA-MB-157

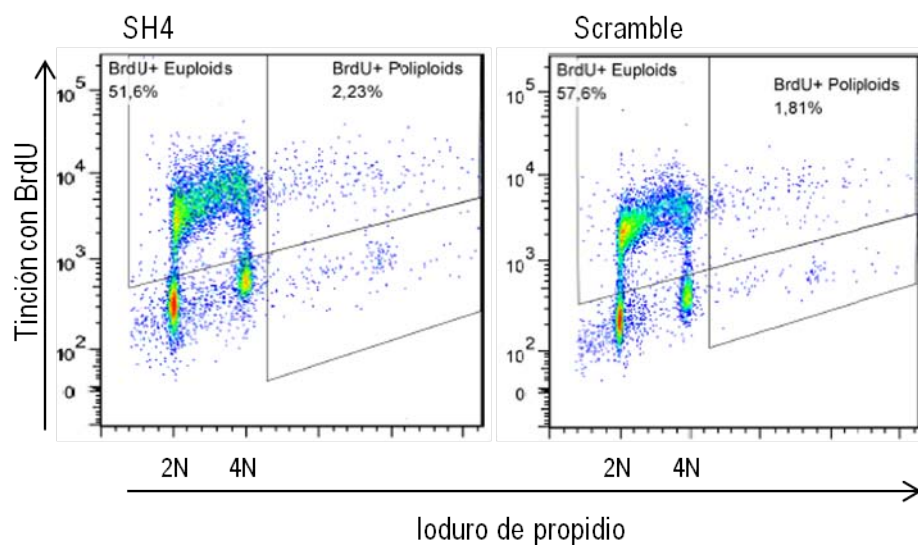
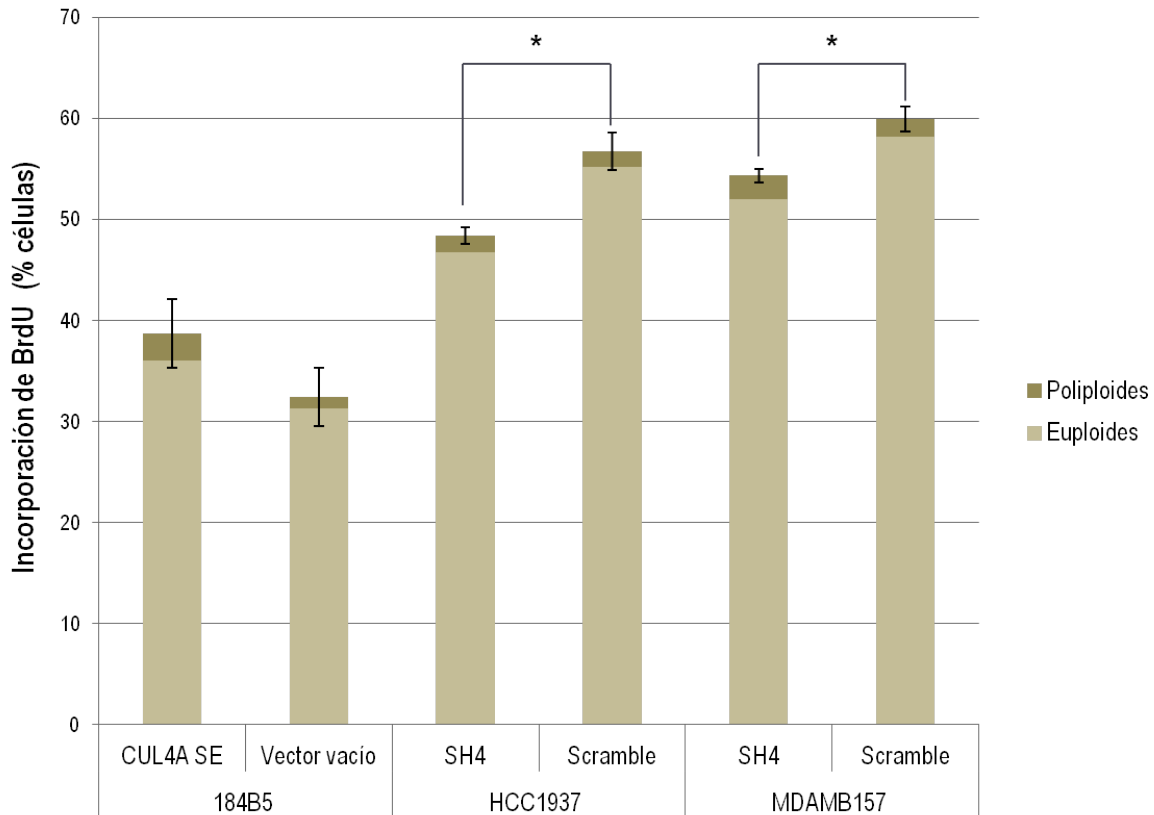


Figura 10. Perfiles de incorporación de BrdU en la fase de síntesis del ciclo celular de las células epiteliales de mama modificadas para la expresión de *CUL4A*. Para estudiar en detalle efectos en la proliferación, las líneas celulares modificadas y sus controles respectivos se plaquearon a una densidad del 70% y se realizó un ensayo de BrdU (incorporado en el ADN de nueva síntesis) combinado con la tinción con loduro de propidio (para la tinción del ADN total). La proliferación se determinó midiendo la incorporación de BrdU tras un pulso de una hora. Las células se fijaron en etanol al 70% y se sometieron a una inmunolocalización con un anticuerpo específico anti-BrdU. Se muestra un experimento representativo de la línea 184B5 con sobreexpresión (SE) de *CUL4A* (A) y de las líneas HCC1937 (B) y MDA-MB-157 (C) con silenciamiento (SH4) del gen. En el eje X se indica el contenido de ADN y en el eje Y la intensidad de la detección del anticuerpo anti-BrdU. Se especifican en cada línea (modificada o control) los porcentajes de células euploides y poliploides que han incorporado BrdU.



**Figura 11. La modulación de la expresión de *CUL4A* en células epiteliales de mama modifica la incorporación de BrdU en la fase de síntesis del ciclo celular.** Porcentaje de células de cada línea celular (modificada o control) que incorporaron BrdU. En el diagrama de barras se representa el valor medio y la desviación estándar de tres experimentos. Se indica la contribución de las células euploides (color claro) y poliploides (color oscuro) al total de BrdU incorporado. Se muestran los resultados correspondientes a la línea 184B5 con sobreexpresión (SE) de *CUL4A* y de las líneas HCC1937 y MDA-MB-157 con silenciamiento (SH4) del gen. El análisis estadístico se llevó a cabo mediante la prueba t de Student; \* $p < 0.05$ , se indican los resultados correspondientes a las comparaciones de los porcentajes totales (sin estratificar en poblaciones euploide y poliploide).

En la línea 184B5 con sobreexpresión de *CUL4A* el porcentaje de células positivas para BrdU fue superior al presentado por las células infectadas con el vector vacío (Figura 11). En términos relativos la expresión exógena de *CUL4A* en la línea 184B5 supuso un incremento del 20% en el porcentaje de células en fase S con respecto a las células control, si bien estas diferencias no alcanzaron significación estadística ( $p > 0.05$ ). Tal como se ha descrito en otras células immortalizadas no transformadas, además de células euploides también se detectó una población de células 184B5 poliploides. Al considerar únicamente las células poliploides también se observó una mayor incorporación de BrdU en las células con sobreexpresión de *CUL4A* que en las células control

(Figura 10A y 11), siendo las diferencias en este caso estadísticamente significativas ( $p < 0.001$ ). Estos resultados sugieren que la sobreexpresión de *CUL4A* podría acelerar la entrada en fase S, traducándose en una proliferación más rápida. Por otra parte, el incremento significativo del número de células poliploides en fase S, indicaría que la sobreexpresión de *CUL4A* podría contribuir al fallo del punto de control tetraploide (*tetraploid checkpoint*) y a la propagación de células poliploides.

El silenciamiento de *CUL4A* en las células tumorales indujo una disminución estadísticamente significativa en el porcentaje de células en fase S comparado con sus respectivas células control ( $p < 0.05$ ) (Figura 11). Dicha disminución relativa a las células control fue de un 15% en la línea HCC1937 y de un 9% en la línea MDA-MB-157. La contribución de células poliploides al porcentaje total de células que incorporan BrdU no fue significativamente diferente entre células modificadas y control en ambas líneas celulares. Por lo tanto la reducción de los niveles de *CUL4A* disminuiría el número de células que entran en fase S, contribuyendo a una menor tasa de proliferación.

Estos resultados, que estarían en consonancia con lo observado en los experimentos de viabilidad y proliferación (Figura 9A, C y D), señalan que la modulación de la expresión de *CUL4A* estaría modificando la tasa de proliferación aparentemente a través del control del porcentaje de células en la fase de síntesis del ciclo celular. Además, la sobreexpresión de *CUL4A* contribuiría a la proliferación de las células poliploides.

#### ❖ **Análisis de la apoptosis mediante marcaje con Anexina V**

Para determinar si las diferencias observadas en la viabilidad celular entre las células modificadas y sus controles se debían en parte a una tasa de muerte celular diferente, se realizó un ensayo de apoptosis mediante la tinción con Anexina V y DAPI. Se valoraron las células que fueron positivas para la tinción con Anexina sin incorporar DAPI e incorporándolo. De esta forma se estudió la apoptosis temprana y la tardía, respectivamente.

En general, se observaron bajos niveles de apoptosis tanto en las células modificadas para la expresión de *CUL4A* como en sus correspondientes controles (Figura 12). La expresión exógena de *CUL4A* no modificó de manera significativa los niveles globales de apoptosis de la línea celular

184B5 (Figura 12A) y tampoco la distribución de las células en apoptosis temprana o tardía. En el caso del silenciamiento de *CUL4A* en los modelos celulares tumorales tampoco se observaron diferencias significativas en el número global de células apoptóticas (Figura 12B y C) ni al considerar separadamente distintas poblaciones celulares en función de la incorporación de DAPI.

De acuerdo con estos resultados la modulación de la expresión de *CUL4A* no tendría un efecto relevante en la muerte celular por apoptosis en los modelos celulares.

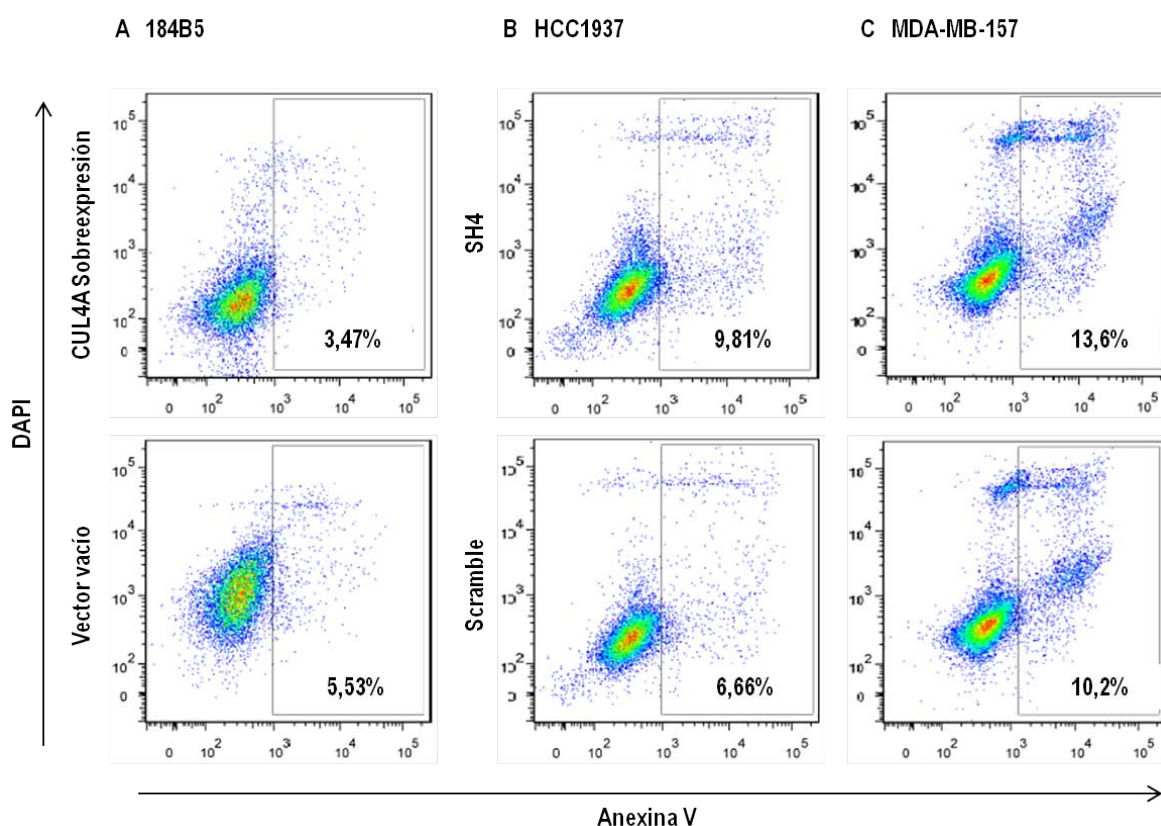


Figura 12. La modulación de la expresión de *CUL4A* en células epiteliales de mama no modifica los niveles de apoptosis. Para estudiar efectos en la muerte celular inducida por apoptosis, las líneas celulares modificadas y sus controles respectivos se plaquearon a una densidad del 70% y se realizó un ensayo de Anexina V combinado con la tinción con DAPI. Se consideraron células apoptóticas aquellas que fueron positivas para la tinción con Anexina combinada con la tinción positiva o negativa para la de DAPI. Los gráficos corresponden a un experimento representativo de tres realizados. Se muestran los resultados correspondientes a la línea 184B5 con sobreexpresión de *CUL4A* y de las líneas HCC1937 y MDA-MB-157 con silenciamiento del gen.

### 2.2.3. Efectos de la modulación de los niveles de expresión de *CUL4A* en la distribución del ciclo celular

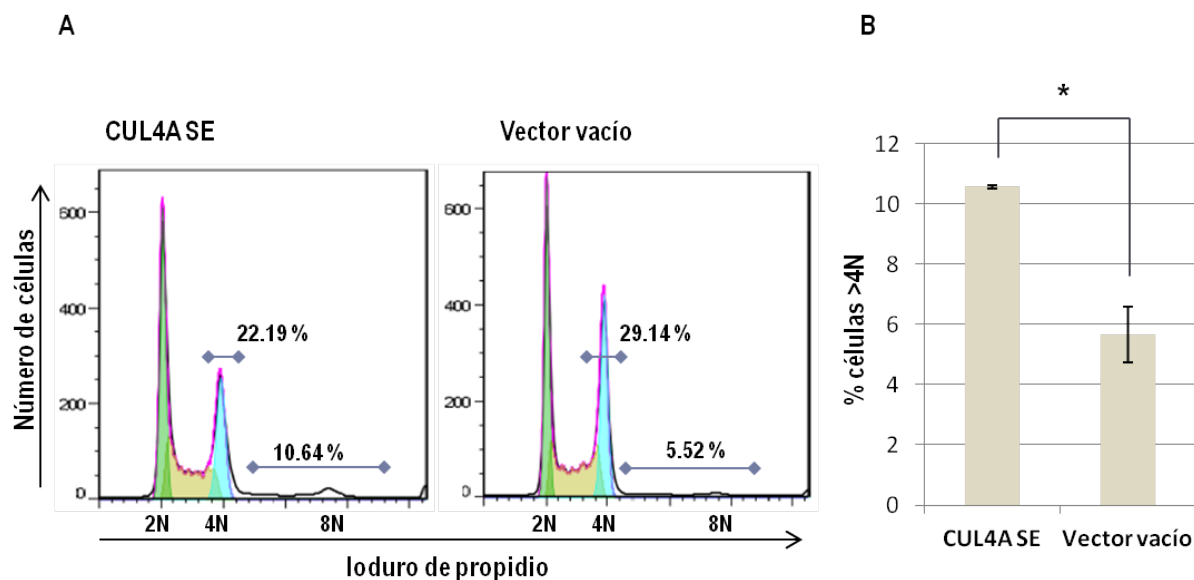
Basándonos en los resultados derivados de los experimentos de incorporación de BrdU (Figura 10A y 11), la sobreexpresión de *CUL4A* no sólo podría favorecer la proliferación de las células 184B5 sino que además, estaría permitiendo la replicación de células con contenido de ADN mayor a 4N o poliploides.

Para seguir explorando el papel de la sobreexpresión de *CUL4A* en la generación de células poliploides y otros posibles efectos en el ciclo celular, se analizó la distribución de las fases del mismo en las células 184B5 con sobreexpresión de *CUL4A* y en las correspondientes células control. Para ello se analizó el contenido de ADN celular mediante tinción con ioduro de propidio y posterior cuantificación por citometría de flujo. En la Figura 13A se muestran un experimento representativo (de tres experimentos realizados) del perfil de tinción de ADN de la línea 184B5 con sobreexpresión de *CUL4A* así como de su respectivo control.

Observamos que aunque en la línea 184B5 control hay una pequeña población de células poliploides, la sobreexpresión de *CUL4A* incrementaría significativamente el porcentaje de las mismas con un valor cercano al doble del obtenido en las células 184B5 infectadas con el vector vacío (Figura 13B). Esta población de células con contenido >4N correspondería a células tetraploides que, tal como indicaban los experimentos con BrdU, serían capaces de entrar en ciclo y replicar su contenido de ADN (alcanzando el valor 8N). Como ya se ha mencionado previamente, este evento podría explicarse a través de un fallo en el funcionamiento del *checkpoint* de tetraploidía o *checkpoint* post-mitótico que existe en G1. La sobreexpresión de *CUL4A* alteraría este punto de control y las células que han finalizado el ciclo anterior con un contenido de ADN 4N (como consecuencia de algún error en el ciclo celular o en la mitosis) no sufrirían parada en G1 prosiguiendo a través de un nuevo ciclo en estado de tetraploidía incrementando la población de células poliploides (8N).

Además, se observó un incremento estadísticamente significativo ( $p < 0.05$ ) en el número de células 4N en las células 184B5 control con respecto a las que sobreexpresan *CUL4A* (Figura 13A). Este incremento, podría explicarse al menos parcialmente por las células tetraploides paradas en G1

como consecuencia de un correcto funcionamiento del *checkpoint* post-mitótico en las células control (en contraposición de lo que ocurriría en las células con sobreexpresión de *CUL4A* donde dicho punto de control estaría comprometido).



**Figura 13.** Efectos de la sobreexpresión de *CUL4A* en la distribución del ciclo celular. Para estudiar modificaciones en la distribución del ciclo celular inducidas por la sobreexpresión de *CUL4A* se realizó una tinción con ioduro de propidio y mediante citometría de flujo se analizó el contenido de ADN de las células 184B5 que sobreexpresan *CUL4A* y de las células control (infectadas con el vector vacío). A) Histogramas correspondientes a un experimento representativo de tres realizados. Los ejes X e Y indican el contenido de ADN y el número de células, respectivamente. Se especifican en cada línea (modificada o control) los porcentajes de células con contenido de ADN 2N, 4N o más de 4N. B) Diagrama de barras que representa los valores medios y desviaciones estándar de tres experimentos realizados. El análisis estadístico se llevó a cabo mediante la prueba t de Student; \* $p < 0.05$ .

#### 2.2.4. Efectos de la modulación de la expresión de *CUL4A* en la capacidad formadora de colonias.

##### ❖ Condiciones dependientes de anclaje

Para determinar si la expresión de *CUL4A* modula la capacidad de crecimiento celular en condiciones dependientes de anclaje se realizó un ensayo de formación de colonias en condiciones de cultivo estándar con los distintos modelos celulares. Para ello se plaquearon tanto las células

modificadas como sus correspondientes controles a igual densidad y tras un periodo de incubación de 9-10 días se realizó una tinción con cristal violeta y se evaluó la existencia de diferencias en el número de colonias formadas. La cuantificación de dichas diferencias se efectuó midiendo la absorbancia obtenida al solubilizar el cristal violeta de las colonias presentes en las placas (proporcional al número de células viables).

Observamos que la sobreexpresión de *CUL4A* en la línea 184B5 produjo un aumento significativo (de aprox. 3 veces) en la capacidad para formar colonias de esta línea comparado con las células control (infectadas con el vector vacío FG12) (Figura 15A). Respecto al silenciamiento de *CUL4A* éste no produjo ningún efecto significativo en la capacidad formadora de colonias de las células no transformadas 184B5 (Figura 15 B). Sin embargo, implicó una reducción significativa del número de colonias formadas en las líneas tumorales HCC1937 y MDA-MB-157 con respecto a las observadas en sus respectivos controles.

En el caso de la línea HCC1937 (Figura 15C), el silenciamiento de *CUL4A* disminuyó el número de colonias entorno a un 55% con respecto a las generadas en las células infectadas con el shRNA *Scramble*. En el caso de la línea MDA-MB-157 (Figura 15D), el silenciamiento de *CUL4A* mediado por el shRNA 4 indujo una reducción de entorno al 45% en la capacidad formadora de colonias de esta línea comparado con las células control. Cabe destacar que la inhibición de la habilidad para formar colonias en condiciones dependientes de anclaje al silenciar *CUL4A* sólo se observó en las líneas celulares tumorales.

Según estos resultados, la modulación de la expresión de *CUL4A* tendría un efecto en la capacidad de las células para formar colonias en condiciones dependientes de anclaje de manera que la sobreexpresión y silenciamiento de este gen producirían un aumento e inhibición de la misma, respectivamente.

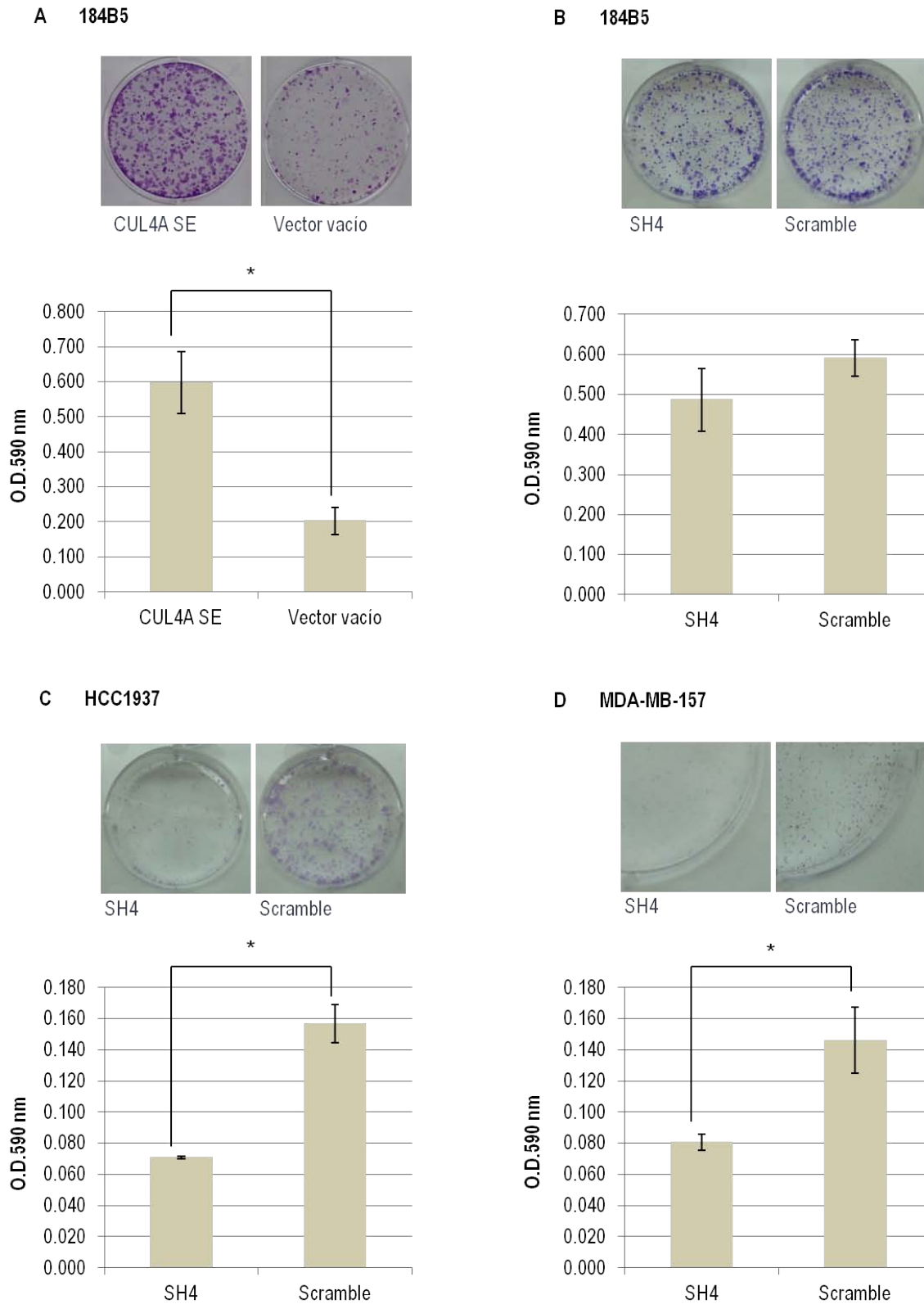


Figura 15. La modulación de la expresión de *CUL4A* en células epiteliales de mama modifica la capacidad para formar colonias en condiciones dependientes de anclaje. Las líneas modificadas y sus controles (línea 184B5 con



sobreexpresión de *CUL4A* A (A) y líneas 184B5 (B), HCC1937 (C) y MDA-MB-157 (D) con silenciamiento del gen), se plaquearon a igual densidad en condiciones de cultivo estándar y transcurridos 9-10 días las células se fijaron con metanol y se tiñeron con cristal violeta (A, B, C, D, paneles superiores). Las gráficas de barras (A, B, C, D, paneles inferiores) representan la absorbancia obtenida al solubilizar el cristal violeta de las colonias presentes en las placas, valor que es proporcional al número de células viables. Se muestran los datos de un experimento representativo de tres experimentos realizados (las barras representan las absorbancias medias y desviaciones estándar de tres o seis réplicas experimentales). El análisis estadístico se llevó a cabo mediante la prueba t de Student; \* $p < 0.05$ .

### ❖ Condiciones independientes de anclaje

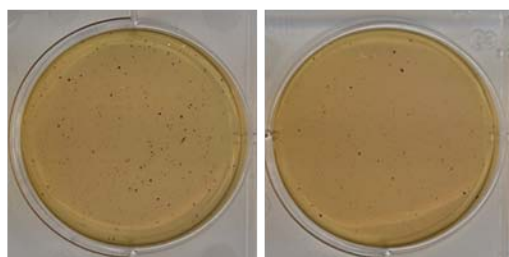
Uno de los rasgos que caracterizan a las células tumorales es que no dependen del anclaje a una superficie para proliferar. Para determinar si la modulación de la expresión de *CUL4A* tiene un efecto en dicha habilidad se realizó un ensayo de formación de colonias en condiciones independientes de anclaje utilizando un medio de crecimiento semisólido (*soft agar*). Las células modificadas y sus respectivos controles se sembraron a igual densidad en medio con agar al 0.3%, se incubaron durante tres semanas y tras la tinción de las colonias formadas con MTT se realizó un conteo de las mismas.

Aunque la línea no tumorigénica 184B5 originalmente está descrita como dependiente de anclaje, actualmente, y de acuerdo con los datos de los proveedores (ATCC, VA, USA), la línea presenta capacidad para crecer en *soft agar*. Por ello no se pudo valorar la adquisición de este rasgo fenotípico al sobreexpresar *CUL4A* y únicamente se pudieron analizar modificaciones de esta característica. De esta forma se pudo determinar que la sobreexpresión de *CUL4A* en las células 184B5 incrementa de manera significativa la capacidad para formar colonias en *soft agar* en relación con las células control (Figura 16A). Por otro lado observamos que el silenciamiento de *CUL4A* en las células tumorales HCC1937 reduce su capacidad para formar colonias en *soft agar* con respecto a las células control (Figura 16B). La línea MDA-MB-157 no posee la capacidad para crecer en *soft agar* por lo que no pudo incluirse en este estudio.

De acuerdo con estos resultados, la modulación de la expresión de *CUL4A* modificaría la capacidad celular de formar colonias en condiciones independientes de anclaje de forma que su

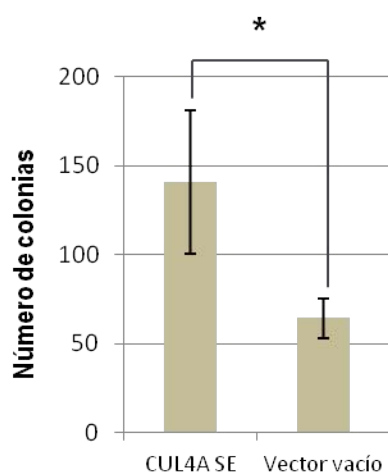
sobreexpresión y silenciamiento conducirían a un incremento y a una disminución de esta habilidad respectivamente.

#### A 184B5

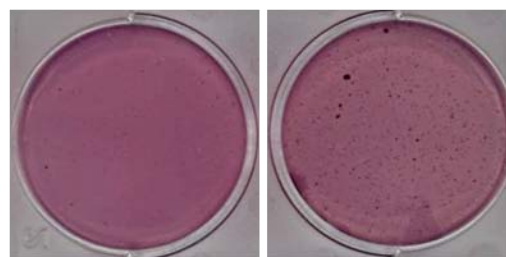


CUL4A SE

Vector vacío

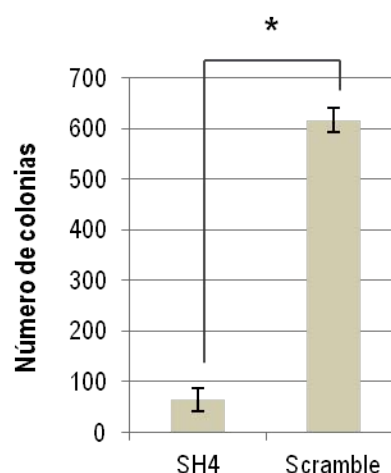


#### B HCC1937



SH4

Scramble



**Figura 16.** La modulación de la expresión de *CUL4A* en células epiteliales de mama modifica la habilidad para formar colonias en condiciones independientes de anclaje. Resultados del ensayo de formación de colonias en condiciones independientes de anclaje correspondientes a las líneas 184B5 con sobreexpresión de *CUL4A* (A) y HCC1937 con silenciamiento del gen (B). Las líneas modificadas y sus controles se plaquearon a igual densidad en soft agar y transcurridas tres semanas las células se tiñeron con MTT (A, B, paneles superiores). Se contaron las colonias (A, B, paneles inferiores) y se analizó la existencia de diferencias significativas entre las líneas con sobreexpresión y silenciamiento de *CUL4A* y sus respectivos controles. Se muestran los resultados de un experimento representativo de dos realizados. Los valores corresponden al valor medio y la desviación estándar de tres réplicas experimentales. El análisis estadístico se llevó a cabo mediante la prueba t de Student; \* $p < 0.05$ .

### 2.2.5.Efecto de la coexpresión de *CUL4A* con los oncogenes *C-Myc* y *H-ras* en la transformación de las células 184B5

El proceso oncogénico es el resultado de la acumulación de distintas mutaciones que activan oncogenes e inactivan genes supresores. Por lo tanto, la transformación de células epiteliales de mama immortalizadas, como son las células 184B5, es un proceso complejo que requiere la colaboración de varios cambios genéticos. En este contexto, nos preguntamos en qué medida la sobreexpresión de *CUL4A* podría cooperar con la expresión de los oncogenes *c-Myc* y *H-ras-V12* en la adquisición de un fenotipo transformado por parte de la línea 184B5. Para ello utilizamos de nuevo un ensayo de formación de colonias en condiciones independientes de anclaje. Puesto que como se ha dicho anteriormente la línea 184B5 ha adquirido en su proceso de expansión “*in vitro*” esta capacidad de crecimiento en soft-agar, quisimos evaluar modificaciones en dicha habilidad al sobreexpresar en las células 184B5 *CUL4A* y *c-Myc*, *CUL4A* y *H-ras-V12* y *CUL4A* simultáneamente con ambos oncogenes.

Para ello tanto las células 184B5 generadas mediante infección lentiviral para expresar de forma estable *CUL4A* como las células control (infectadas con el vector FG12) se modificaron mediante un sistema retroviral para expresar de manera ectópica *c-Myc* y *H-ras-V12* (por separado y conjuntamente). Tras la selección celular apropiada, se comprobó la sobreexpresión del gen (o genes) transducido(s) mediante WB. Se observó que la transducción individual de *c-Myc* duplicó la expresión del oncogén tanto en las células que sobreexpresaron *CUL4A* como en las células control (vector FG12) (Figura 17A). Sin embargo, no se consiguieron incrementar los niveles proteicos de *c-Myc* en las células transducidas con ambos oncogenes (Figura 17A). En el caso de la expresión exógena de *H-Ras-V12*, se obtuvo el aumento (dos veces) de sus niveles proteicos tanto en la transducción individual del oncogén como en la conjunta con *c-Myc* (Figura 17B).

Finalmente, las células con expresión de *CUL4A* y células control transducidas con *c-Myc* (o *H-ras-V12* o ambos genes) se sembraron a igual densidad en medio con agar al 0.3%, se incubaron durante tres semanas y se realizó el conteo de las colonias formadas tras su tinción con MTT.

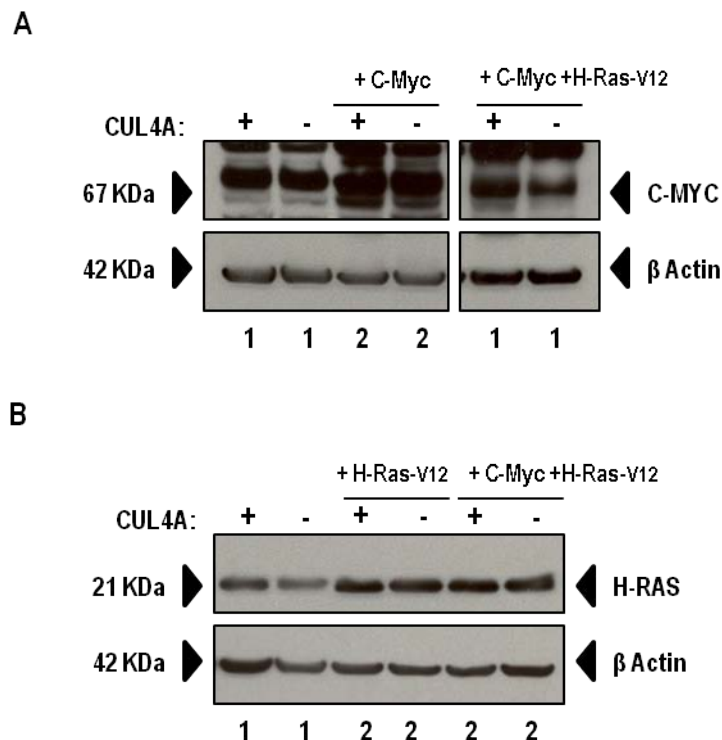


Figura 17. Incremento de la expresión de los oncogenes *C-Myc* y *H-Ras-V12* en la línea 184B5 modificada para la expresión de *CUL4A*. Se muestran los niveles de expresión de *C-Myc* (A) y *H-Ras-V12* (B) determinados mediante WB correspondientes a las infecciones retrovirales (individuales o conjuntas de los oncogenes) de las células 184B5 (con sobreexpresión de *CUL4A* y control). En ambos inmunoblots, los valores relativos se normalizaron con la expresión de Beta Actina. (+) Sobreexpresión de *CUL4A*; (-) Vector FG12.

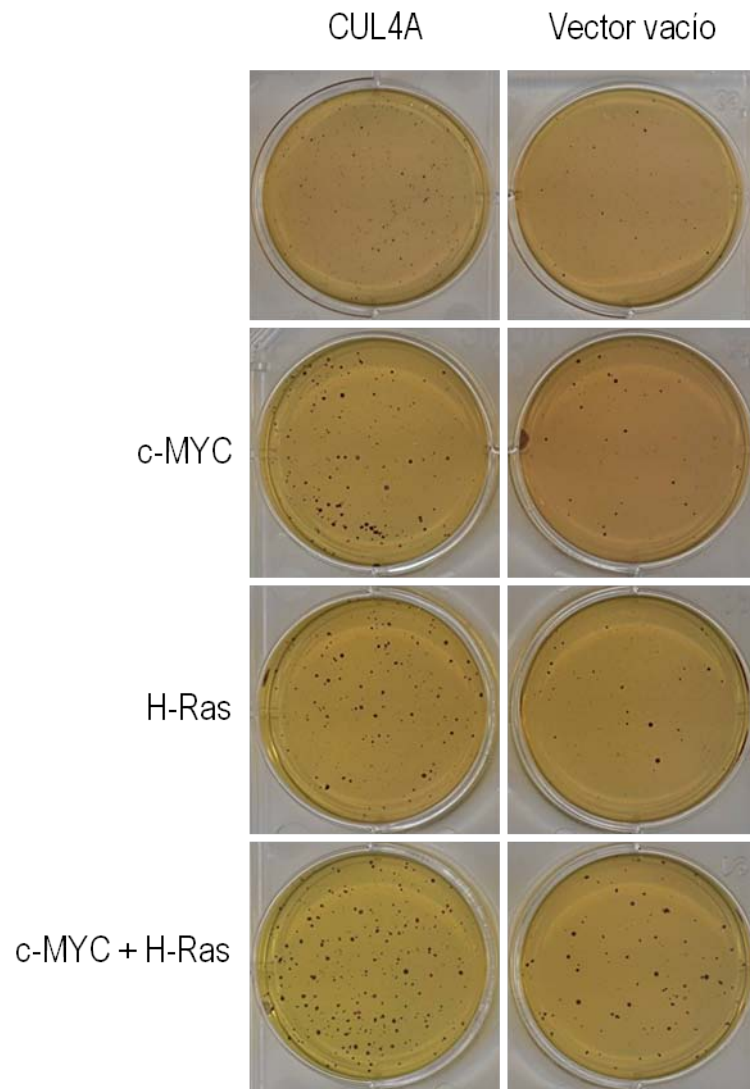
Se observó que el número de colonias formado por las células con sobreexpresión de *CUL4A* era superior al contabilizado en las células control (infectadas con el vector vacío FG12) tanto en células 184B5 que únicamente sobreexpresan *CUL4A* (tal como se ha descrito previamente en este trabajo) como en células que además sobreexpresan *c-Myc*, o *H-ras-V12* o ambos oncogenes (Figura 18). Las diferencias en el número de colonias fue estadísticamente significativo en todos los casos excepto en la coexpresión de *CUL4A* y *c-Myc*.

Al valorar posibles diferencias en el efecto inducido por la sobreexpresión de *CUL4A* dependiendo de la expresión concomitante de *c-Myc*, *H-ras-V12* o de ambos oncogenes se observó que la magnitud del incremento en el número de colonias con respecto al control al coexpresar *CUL4A* y *H-ras-V12* fue significativamente superior a la observada con la sobreexpresión individual de *CUL4A* (aprox. X4 veces relativo al control *versus* X2 veces relativo al control,  $p < 0.01$ )

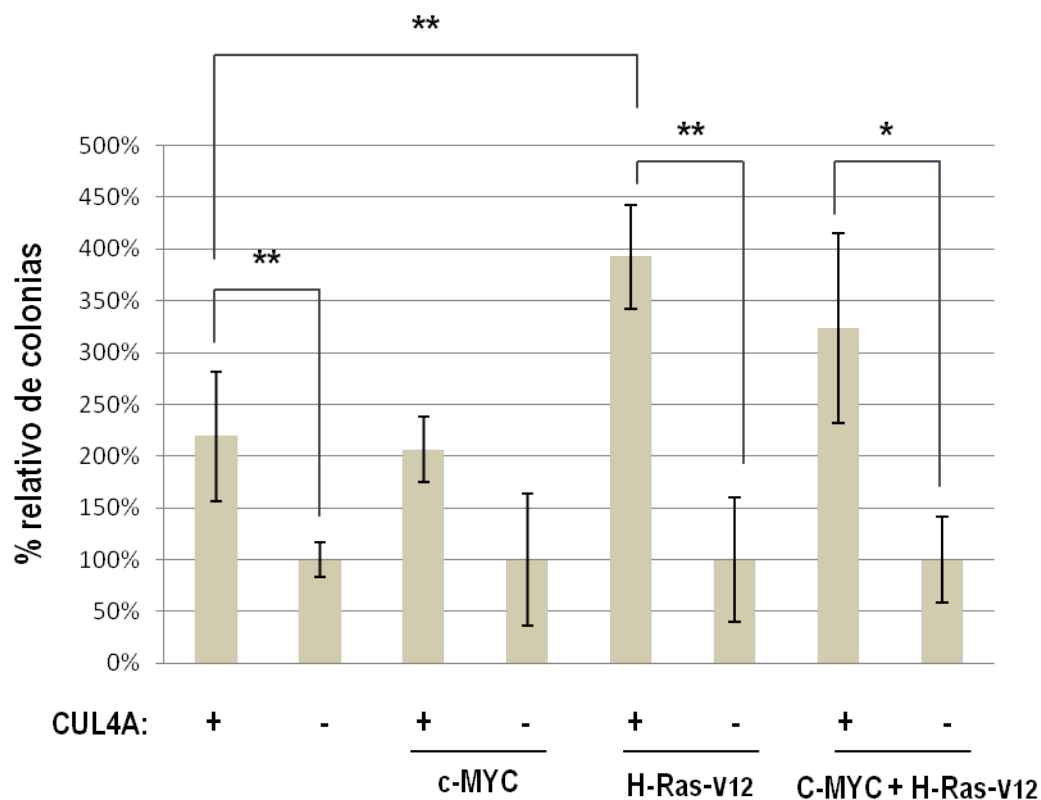
(Figura 18B). El efecto de la sobreexpresión de *CUL4A* fue también superior en las células 184B5 que además coexpresaban *c-Myc* y *H-ras-V12*, si bien las diferencias no fueron significativas. De cualquier modo en este modelo el posible efecto cooperativo con *CUL4A* se explicaría únicamente por la sobreexpresión de *H-ras-V12* ya que de acuerdo con los WBs en este modelo no se logró sobreexpresar *c-Myc*. No se observaron diferencias en la magnitud del efecto inducido por la sobreexpresión individual de *CUL4A* respecto al observado al coexpresar *CUL4A* y *c-Myc*.

Conforme a estos resultados, la sobreexpresión de *CUL4A* estaría colaborando con las capacidades oncogénicas de *H-ras-V12*, de tal forma que las células 184B5 que sobreexpresan ambos genes tendrían mayor habilidad para crecer en un medio semisólido. Esta mayor efectividad para crecer en condiciones independientes de anclaje podría ser un reflejo de la cooperación entre estos genes para promover la transformación de las células 184B5 e incrementar su estado de malignidad.

A



**B**



**Figura 18. *CUL4A* colabora con *H-RAS-V12* en la transformación de las células 184B5.** Para valorar efectos en la habilidad para formar colonias en condiciones independientes de anclaje se realizó un ensayo de formación de colonias en un medio semisólido (soft agar). Las células se plaquearon a igual densidad celular (30000 células por pocillo). Transcurridas tres semanas, las células se tiñeron con MTT y se contaron las colonias. Se realizaron dos experimentos, cada uno de ellos con tres réplicas experimentales. Se muestran las imágenes y el análisis estadístico de un experimento representativo. (A) Imágenes de los resultados de los experimentos de *soft agar* de las células 184B5 infectadas con *CUL4A* y con el vector vacío (FG12) y cotransducidas con los oncogenes *c-Myc*, *H-ras-V12*, o ambos. (B) Análisis estadístico de la cuantificación del número de colonias mostrados en A. Los valores corresponden al valor medio y la desviación estándar de tres réplicas experimentales. Los datos muestran el porcentaje de colonias relativo al correspondiente control. El análisis estadístico se efectuó mediante la prueba t de Student; \*\*p<0.01, \*p<0.05. (+) Sobreexpresión de *CUL4A*; (-) Vector vacío.

## 2.3. Experimentos *In vivo*:

### 2.3.1. Inoculación ortotópica de las líneas celulares con sobreexpresión y silenciamiento de *CUL4A* en ratones inmunodeprimidos.

En vista de los resultados obtenidos en los experimentos "*in vitro*" decidimos caracterizar "*in vivo*" las propiedades oncogénicas de *CUL4A*. Para ello se inocularon los modelos celulares de sobreexpresión y silenciamiento de *CUL4A*, así como las respectivas células control, en ratones inmunodeprimidos mediante xenotrasplantes ortotópicos. A lo largo de los experimentos se evaluó la aparición de tumores en las mamas de los ratones y se cuantificó periódicamente el volumen de los mismos (una vez por semana hasta que el volumen tumoral u otra sintomatología requirió el sacrificio de los animales). Cada semana se calculó el volumen medio de los tumores en cada grupo experimental.

Observamos que la sobreexpresión de *CUL4A* en la línea 184B5 no indujo la formación de tumores en las mamas de los ratones inmunodeprimidos puesto que, transcurridas 15 semanas desde la inoculación, no se observaron signos de malignidad en las mismas.

Respecto a las líneas con silenciamiento de *CUL4A*, tras realizar un experimento piloto en el que se comprobó que las líneas MDA-MB-157 y HCC1937 infectadas con el control *Scramble* eran capaces de formar tumores al implantarlas en las mamas de los ratones, se procedió a evaluar si el silenciamiento del gen producía algún efecto en el desarrollo o el crecimiento de los mismos. La inoculación de las células HCC1937 y MDA-MB-157 infectadas con el shRNA específico de *CUL4A* también indujo la formación de tumores en los ratones. Sin embargo, en ambas líneas celulares observamos diferencias entre las células control y las células con el silenciamiento del gen en cuanto al ritmo de crecimiento de los mismos.

En la Figura 19 se representan las curvas de crecimiento de los tumores generados por las células con silenciamiento de *CUL4A* y de los tumores derivados de las células *Scramble*. Los valores medios semanales se presentan relativos a al valor medio obtenido la semana en que se comenzaron a detectar masas palpables en las zonas de los inóculos. Las células HCC1937 (con silenciamiento y control) comenzaron a generar tumores tres semanas después de la inoculación de

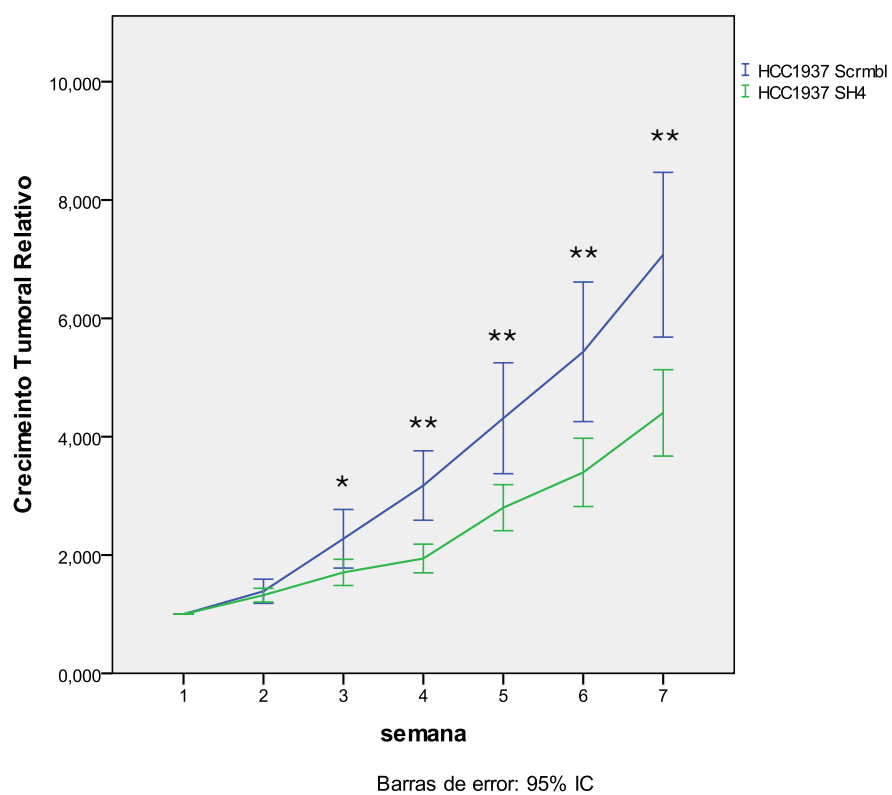


las células (semana uno en la Figura 19A). La velocidad de crecimiento de los tumores generados por las células con silenciamiento de *CUL4A* fue menor que la de los tumores procedentes de los inóculos control, siendo las diferencias estadísticamente significativas a partir de la cuarta semana después de la aparición de los tumores. En concreto, en la semana siete los tumores derivados de las células silenciadas tenían un volumen medio igual a cuatro veces el determinado en la primera semana. Sin embargo, en el mismo periodo de tiempo los tumores originados a partir de las células *Scramble* alcanzaban un volumen medio equivalente a ocho veces el obtenido en la semana uno.

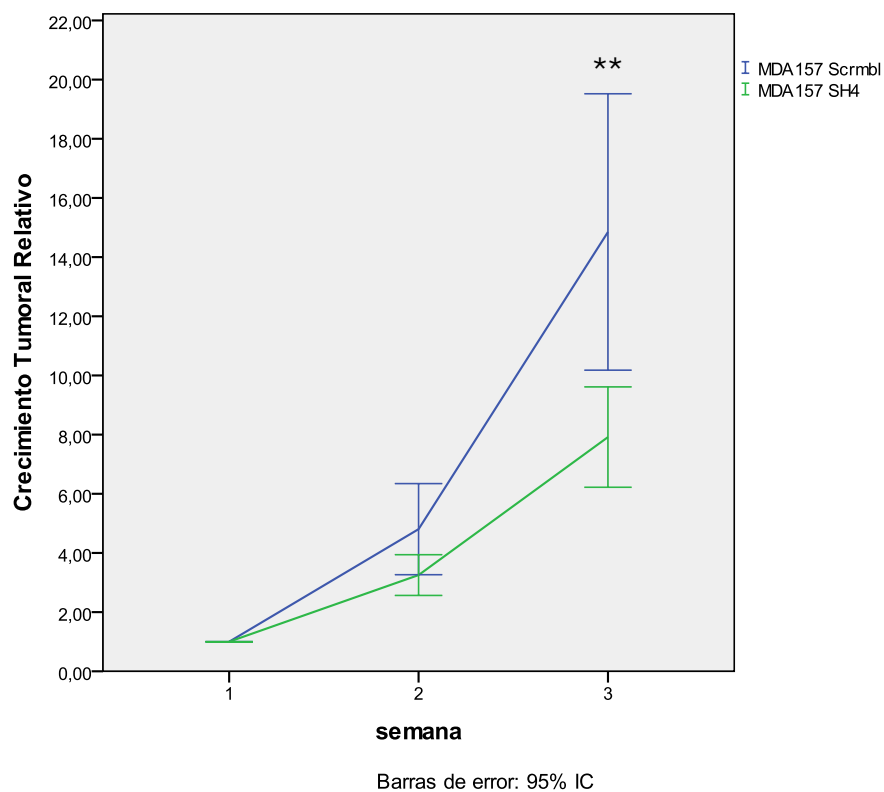
Los tumores formados por la línea MDA-MB-157 fueron mucho más agresivos que los originados por la línea HCC1937. Comenzaron a desarrollarse la semana posterior a la inoculación (semana uno en la Figura 19B) y presentaron tasas de crecimiento superiores a las mostradas por tumores generados por la línea HCC1937 (Figura 19A). Independientemente de esa mayor agresividad, al igual que en la línea HCC1937, observamos una reducción en la tasa de crecimiento de los tumores generados por las células con silenciamiento de *CUL4A* comparada con la presentada por los tumores derivados de las células *Scramble*. Debido al volumen alcanzado por los tumores, el experimento tuvo que finalizarse en la semana tres a partir de la inoculación. En dicha semana los tumores con silenciamiento de *CUL4A* presentaban ocho veces el volumen determinado al comenzar las mediciones mientras que en las células control el volumen multiplicaba por 15 el inicial, diferencias que fueron estadísticamente significativas.

Estos resultados indicarían que la sobreexpresión de *CUL4A* "*per se*" no sería suficiente para malignizar o transformar células inmortalizadas y dotarlas de la capacidad de desarrollar tumores *in vivo*. Sin embargo, muestran que el silenciamiento de *CUL4A* contribuiría a disminuir el crecimiento tumoral *in vivo*, corroborando los datos previos obtenidos en los experimentos *in vitro* y reforzando el posible papel que la sobreexpresión de este gen podría tener en la agresividad tumoral.

A



B



**Figura 19. El silenciamiento de la expresión de *CUL4A* en las líneas celulares tumorales HCC1937 y MDA-MB-157 reduce el crecimiento tumoral en ensayos *in vivo*.** Las células HCC1937 (A) y MDA-MB-157 (B) infectadas con el shRNA específico de *CUL4A* y con el shRNA control (Scramble) fueron inoculadas en ratones inmunodeprimidos mediante xenotrasplantes ortotópicos. Para cada línea y condición experimental se representa el incremento del volumen tumoral relativo al obtenido en el momento en que se detectó la formación de tumores (semana 1 en los gráficos). Se utilizaron 10 animales por condición experimental, realizándose 2 inóculos por animal (n=20). Los valores representados corresponden a valores medios e intervalos de confianza. El análisis estadístico se efectuó a través la prueba U de Mann-Whitney; \*p<0.05 con respecto a control, \*\*p<0.01 con respecto a control.

### 2.3.2. Caracterización inmunohistoquímica de los tumores derivados de los xenotrasplantes.

Para comprobar que la inhibición en el crecimiento tumoral observado en los xenotrasplantes de las líneas modificadas HCC1937 y MDA-MB-157 se asociaba con la menor expresión de *CUL4A* se realizó un análisis inmunohistoquímico con un anticuerpo específico anti-*CUL4A*. Además, se valoraron diferentes rasgos asociados con malignidad como son la formación de vasos sanguíneos (angiogénesis) y la formación de vasos linfáticos (linfangiogénesis) mediante el análisis inmunohistoquímico de los marcadores CD31 y LyVE-1, respectivamente. La formación de ambos tipos de vasos se vincula con un mayor crecimiento del tumor y con el aumento de la capacidad metastática debido a la posible diseminación de las células tumorales a través de los mismos. Finalmente, como indicador de proliferación de las células tumorales se valoró la expresión de Ki-67. Además del estudio inmunohistoquímico se evaluó la formación de masas tumorales en los ganglios linfáticos y pulmones de los ratones inoculados con las líneas celulares.

El panel de anticuerpos utilizados y los detalles específicos de cada uno de ellos se detallan en la Tabla 3 del apartado de Métodos. En el análisis de los distintos marcadores se comparó la tinción de los tumores originados en los ratones inoculados con las líneas silenciadas y con la de los tumores de los ratones inoculados con las células control.

El análisis inmunohistoquímico nos permitió verificar la existencia de menores niveles de expresión de *CUL4A* en los tumores derivados de las líneas HCC1937 y MDA-MB-157 con silenciamiento de *CUL4A* comparados con los obtenidos en los tumores originados a partir de las

células control (Figura 20A y B, respectivamente). Cabe destacar que la disminución de la tinción de CUL4A en las células silenciadas no se produjo de manera homogénea, se observó una distribución parcheada de la tinción en la que se encontraron zonas con marcaje más tenue y zonas con marcaje más intenso aunque sin alcanzar los niveles observados en los xenografts derivados de las células control (Figuras 20A y B). El análisis del silenciamiento de *CUL4A* en las líneas celulares mediante WB evidenció una reducción notable de la expresión del gen (Figura 8). Sin embargo, las células denominadas “silenciadas para la expresión de *CUL4A*”, ya sean procedentes de la línea HCC1937 o de la línea MDA-MB-157, conciernen a un conjunto heterogéneo de células transducidas mediante infección lentiviral en las que el shRNA para *CUL4A* se ha integrado en lugares diferentes del genoma de la célula, pudiendo conferir diferentes grados de silenciamiento del gen. Es por esto que, aunque en el sistema *in vitro* mediante WB veamos una reducción global de los niveles de la proteína (Figura 8), las células que conserven niveles medios o basales de expresión pueden que aumente en número en condiciones *in vivo* (Figura 20 a y c) puesto que tener CUL4A confiere una ventaja proliferativa.

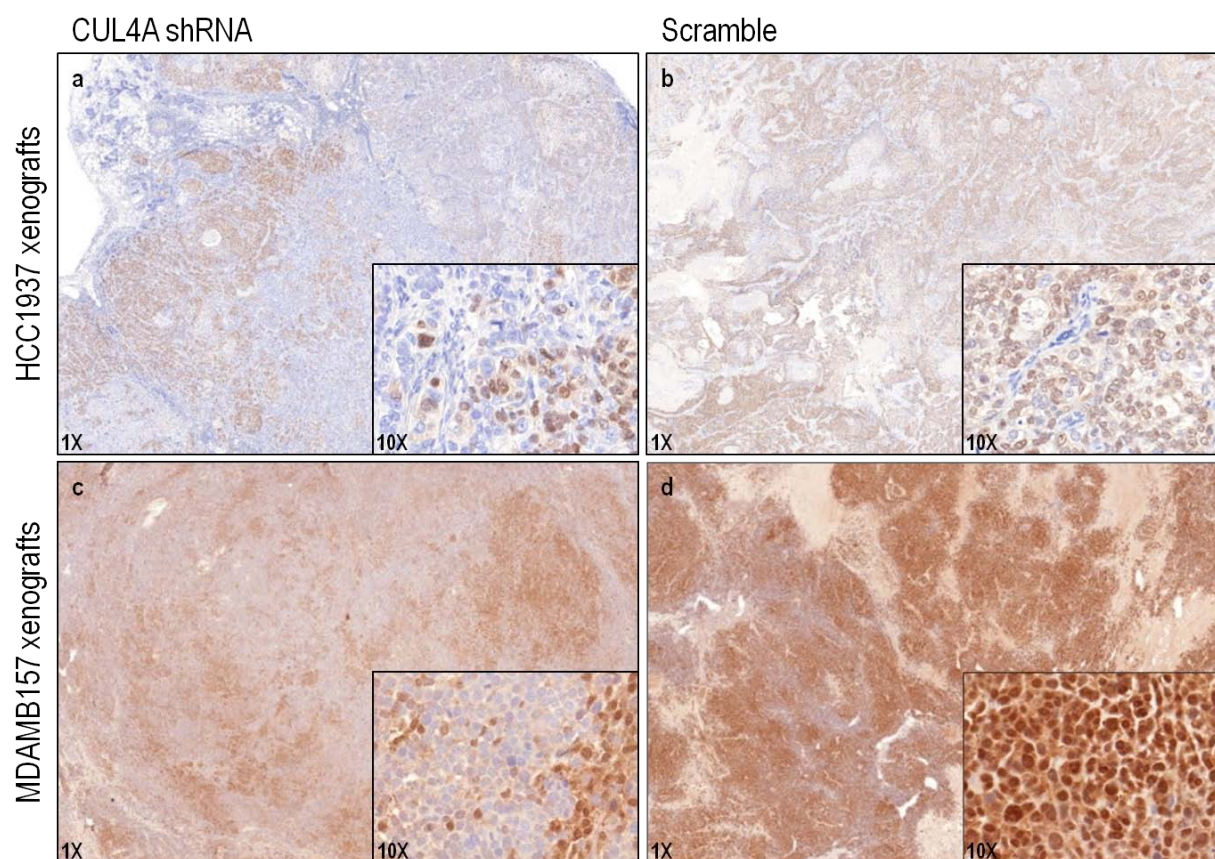


Figura 20. Tinción inmunohistoquímica de CUL4A en las células tumorales derivadas de xenotrasplante. Los tumores originados por la inyección de las células MDA-MB-157 (silenciamiento y control) y HCC1937 (silenciamiento y

control) en las mamas de ratones inmunodeprimidos se embebieron en parafina y se tiñeron mediante inmunohistoquímica para evaluar expresión de CUL4A. Se muestran imágenes representativas de las tinciones de CUL4A en los xenotrasplantes derivados de las células HCC1937 silenciadas (a, CUL4A shRNA) y control (b, Scramble) y de las células MDA-MB-157 silenciadas (c, CUL4A shRNA) y control (d, Scramble). Las imágenes corresponden a campos con 1X y 10X aumentos, recuadro grande e inserto, respectivamente.

El estudio de la linfangiogénesis, y la angiogénesis no reveló diferencias significativas entre los tumores originados por las células silenciadas y los formados por las células control. Asimismo, no se observaron modificaciones en los niveles de Ki-67 entre ambos tipos tumorales. Por otro lado, el estudio de los pulmones y los ganglios de los ratones inmunodeprimidos inoculados con las líneas silenciadas o las células control no mostró la presencia de células o masas tumorales en los mismos.

La tinción diferencial de CUL4A en los dos tipos de tumores (derivados de células silenciadas o células control) corrobora que la disminución de los niveles de expresión de *CUL4A* está asociada con la reducción del tamaño tumoral *in vivo* (Figura 19). Sin embargo, los marcadores estudiados no aportaron información sobre los mecanismos moleculares subyacentes al fenotipo generado por el silenciamiento del gen.

## **2.4. Mecanismo molecular del efecto oncogénico de *CUL4A*: posibles moléculas y/o rutas moleculares mediadoras**

### **2.4.1. Modulación de diferentes dianas de *CUL4A* conocidas**

La E3 ubiquitin ligasa *CUL4A* desempeña un papel importante en diversas funciones celulares mediante el marcaje y la posterior degradación vía proteosomal de un conjunto conocido de proteínas. De esta forma, se sabe su implicación en la regulación del *checkpoint* en G1/S a través del control de la estabilidad de las proteínas inhibidoras de kinasa dependiente de ciclina p21 (Nishitani et al, 2006; Kim et al, 2008) y p27 (Higa et al., 2006b). Se estimó oportuno el estudio de estas proteínas para arrojar información sobre la relación de *CUL4A* con los fenotipos observados en nuestros modelos celulares.

Además, se ha descrito que el complejo E3 ubiquitina ligasa CUL4A marcaría para degradación a la proteína supresora de tumores p53 (Lee & Zhou, 2012). Debido a que p53 está implicada en el control del *checkpoint* de tetraploidía en G1 (referencia) se consideró interesante examinar el papel de la sobreexpresión de *CUL4A* en este proceso a través de la regulación de p53 en la línea celular 184B5 la cual conserva la proteína p53 *wild-type* (referencia).

Se exploraron mediante WB, usando anticuerpos específicos, los niveles de expresión de p21 y p27 en los modelos celulares 184B5 y HCC1937 de sobreexpresión y silenciamiento, respectivamente. Las células se trataron con cicloheximida durante los tiempos indicados en la Figura 21. No se pudo estudiar de la misma forma la línea MDA-MB-157 debido a que los niveles basales de ambas proteínas técnicamente no se pudieron valorar en los WB. El estado de p53 se estudió puntualmente (sin la adición a las células de cicloheximida) en el modelo de sobreexpresión 184B5 (Figura 22).

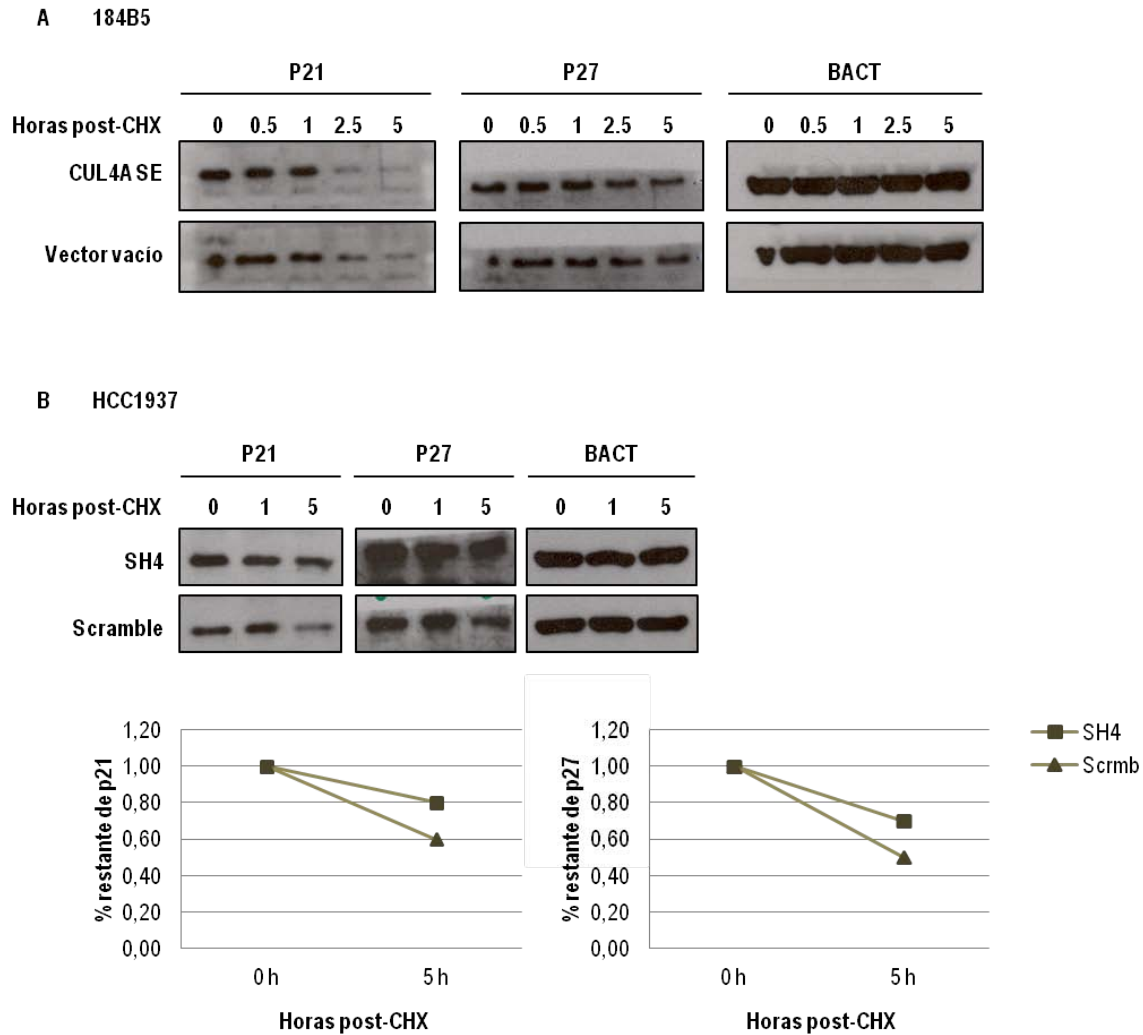


Figura 21. Modificación de los niveles proteicos de p21 y p27 en los modelos celulares de mama. Se muestra el análisis mediante cicloheximida de la vida media de las proteínas de p21 (A) y p27 (B) en las líneas HCC1937 (silenciamiento y Scramble) y 184B5 (sobreeexpresión y control) determinados mediante WB. Las células se trataron con cicloheximida (40 µg/ml) y se recogieron las proteínas en los tiempos 0, 0.5, 1, 2.5 y 5 horas. Bajo cada carril se indican los valores de expresión de CUL4A relativos a los obtenidos en las infecciones con el control *Scramble* y normalizados con la expresión de Beta Actina. CHX: cicloheximida.

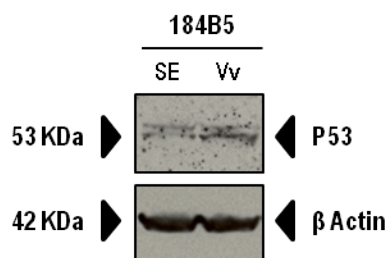


Figura 22. Modificación de los niveles proteicos de p53 en la línea celular 184B5. Se exponen los niveles de expresión de p53 en la línea celular 184B5 (sobreeexpresión y control).

La sobreexpresión de *CUL4A* en la línea 184B5 no disminuyó los niveles de las proteínas p21 y p27 (Figura 21A). Por otro lado, en la línea HCC1937 con silenciamiento de *CUL4A* se observó la acumulación de ambas proteínas (Figura 21B). El aumento de los niveles proteicos de p21 y p27 conduciría a un bloqueo de la transición G1/S del ciclo celular que reflejaría la menor tasa de proliferación observada al silenciar *CUL4A* en las líneas tumorales (Figura 9C).

Por otra parte, la disminución de los niveles de p53 al sobreexpresar *CUL4A* (Figura 22) podría explicar el fenotipo observado en los experimentos proliferación (Figura 9A) ya que es un supresor tumoral que regula negativamente el ciclo celular. Además, esclarecería los resultados de ciclo celular y BrdU (Figuras 13 y 10A) puesto que la disminución de p53, regulador del *checkpoint* de tetraploidía en G1, contribuiría a la entrada en fase S de células tetraploides y al aumento de la población de células poliploides observado al sobreexpresar *CUL4A* en las células 184B5.

#### **2.4.2. Impacto de la modulación de *CUL4A* en el patrón global de expresión proteica de los modelos celulares.**

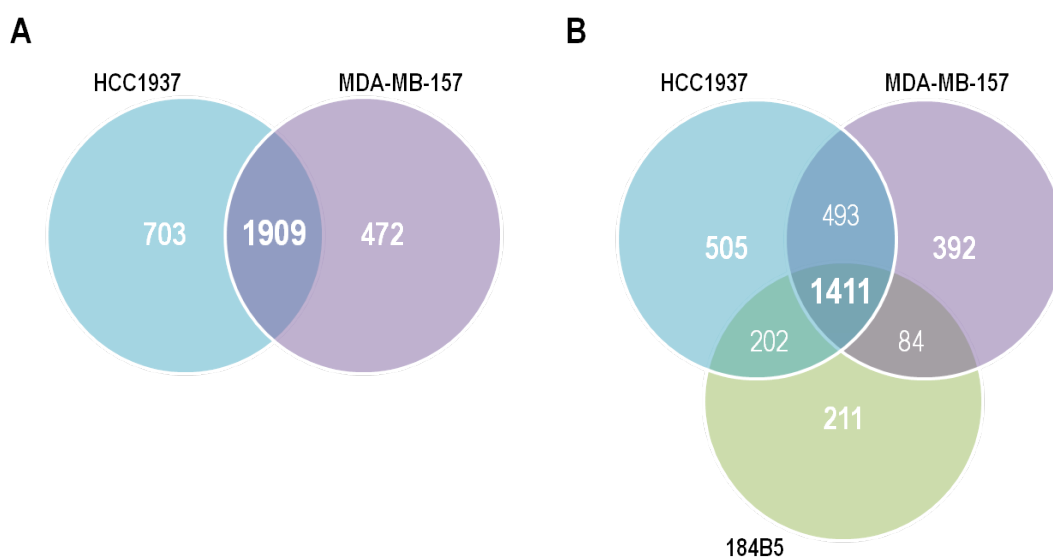
Con el objetivo de realizar un estudio global de las proteínas potencialmente reguladas (directa o indirectamente) por los niveles de *CUL4A* y que podrían estar implicadas en los fenotipos observados en nuestros experimentos *in vitro* e *in vivo* se llevó a cabo un análisis de las proteínas que se expresan diferencialmente entre las células con sobreexpresión y silenciamiento de *CUL4A* y sus respectivos controles. Para la identificación y cuantificación de proteínas se realizó un abordaje proteómico basado en técnicas de espectrometría de masas acopladas al marcaje isobárico estable (iTRAQ).

En el análisis del patrón de expresión proteica de las líneas HCC1937 y MDA-MB-157 (sin hacer distinción entre células silenciadas y células *Scramble*) se identificaron 2612 y 2381 proteínas en cada línea celular, respectivamente. Teniendo en cuenta ambos conjuntos de datos se identificaron un total de 3084 proteínas, de las cuales un 62% (1909 proteínas) fueron comunes para ambas líneas celulares como se ilustra en el diagrama de Venn de la Figura 23A.



Una vez definidas las proteínas comunes en los modelos de silenciamiento se añadió la información derivada del análisis del patrón de expresión proteica de la línea 184B5. En esta línea (sin diferenciar entre células con sobreexpresión de *CUL4A* y células control) se identificaron 1908 proteínas.

Teniendo en cuenta los datos de los tres experimentos de iTRAQ, se determinó que el total de proteínas identificadas fue de 3298. De éstas, se determinó que un 43% (1411 proteínas) fue común a los tres análisis (Figura 23B).



**Figura 23. Análisis mediante Diagrama de Venn de las proteínas comunes entre los modelos celulares estudiados por iTRAQ.** Se representan mediante círculo azul, morado y verde las líneas celulares HCC1937, MDA-MB-157 y 184B5, respectivamente. En (A) se ilustra el solapamiento de los datos generados por iTRAQ entre los modelos celulares HCC1937 y MDA-MB-157 y, en (B) se añaden los datos de iTRAQ para la línea 184B5. En las zonas de interacción de los círculos se indica el número de proteínas comunes entre los modelos celulares correspondientes. Dentro de cada círculo se indica el número de proteínas específico de cada línea.

Una vez determinados los ratios de expresión entre cada línea celular y su control correspondientes a las 1411 proteínas comunes a los tres modelos analizados, se seleccionaron aquellas proteínas que presentaron la misma tendencia de expresión en los dos modelos de silenciamiento de *CUL4A* y una tendencia en sentido opuesto en el modelo de sobreexpresión. De acuerdo con este planteamiento se encontraron 348 proteínas con tendencia a estar reprimidas en las células HCC1937 y MDAMB157 con silenciamiento de *CUL4A* (con respecto a sus

respectivas células control; ratios <1) y que, por el contrario, tendían a sobreexpresarse en las células 184B5 con sobreexpresión de *CUL4A* (en relación con sus células control; ratios >1). Por otra parte se identificaron 187 proteínas con el comportamiento opuesto, es decir, presentaban tendencia a sobreexpresarse en las dos líneas tumorales con silenciamiento de *CUL4A* en relación a los controles y, sin embargo, tendían a estar reprimidas en la línea 184B5 en comparación con las células 184B5 control.

Aunque con ambos grupos de proteínas se realizará un análisis funcional “in silico” que aportará información general sobre posibles rutas celulares moduladas por *CUL4A*, para el presente trabajo de tesis se comenzó por generar una lista restringida de proteínas candidatas. Para ello se aplicaron puntos de corte en los ratios de expresión para filtrar proteínas diferencialmente expresadas y se utilizaron distintos criterios de selección.

Respecto a los puntos de corte para seleccionar proteínas diferencialmente expresadas se establecieron dos niveles de exigencia, uno más permisivo (ratio <0.833, represión; ratio >1.2, sobreexpresión) y, otro más restrictivo (ratio <0.7, represión; ratio >1.3, sobreexpresión).

Respecto a los criterios de selección se establecieron cinco condiciones que generaron sendas listas: Lista 1) Proteínas reprimidas en los dos modelos de silenciamiento de *CUL4A* y sobreexpresadas en el modelo de sobreexpresión de *CUL4A*. Lista 2) Proteínas reprimidas en al menos uno de los modelos de silenciamiento de *CUL4A* (ausencia de dato o efecto en el otro) y sobreexpresión en el modelo de sobreexpresión. Lista 3) Proteínas sobreexpresadas en al menos uno de los modelos celulares de silenciamiento (ausencia de dato o efecto en el otro) y reprimidas en el modelo de sobreexpresión. Lista 4) Proteínas reprimidas en ambos modelos celulares de silenciamiento y ausencia de dato o efecto en el modelo de sobreexpresión. Lista 5) Proteínas sobreexpresadas en ambos modelos celulares de silenciamiento y ausencia de dato o efecto en el modelo de sobreexpresión. No se encontró ninguna proteína sobreexpresada en los dos modelos de silenciamiento y reprimida en el de silenciamiento.

Conforme a estos criterios se seleccionaron 41 proteínas candidatas a ser moduladas por la expresión de *CUL4A* que quedan reflejadas en la Tabla 4. De acuerdo con lo esperado, y como control experimental, una de las dos proteínas que cumplieron los criterios de la lista 1 (proteínas reprimidas en los dos modelos de silenciamiento de *CUL4A* y sobreexpresadas en el modelo de sobreexpresión de *CUL4A*) fue CUL4A. De hecho, fue la proteína más diferencialmente expresada de todas las identificadas por iTRAQ en las líneas celulares.

De entre las proteínas presentes en esta lista restringida de candidatas a estar moduladas por *CUL4A* se encuentran ISG15 y UBA3 vinculadas con procesos similares a la ubiquitinación; las proteínas H2AFY, HIST1H4A y HMGMN1 implicadas en la remodelación de la cromatina; MKI67 relacionada con proliferación celular; las proteínas TJP1 y TMPO asociadas con funciones de adhesión celular; o, las proteínas ARHGAP29, MYH9, MYH10 y MYH14 que participan en la ruta molecular Rho.

En la lista 1, con las condiciones más exigentes (proteínas reprimidas en los dos modelos de silenciamiento de *CUL4A* y sobreexpresadas en el modelo de sobreexpresión de *CUL4A*), únicamente se identificó la Metalotioneina-2 (MT2A). Por lo tanto se decidió comenzar por esta proteína para validar su papel como posible mediadora de los fenotipos observados al modificar la expresión de *CUL4A*.

**Tabla 4. Proteínas potencialmente moduladas por la expresión de *CUL4A* identificadas mediante iTRAQ en los modelos celulares de silenciamiento y sobreexpresión.** (a) Número de acceso de cada proteína de acuerdo con la base de datos Swiss Prot, Homo Sapiens. (b) Para cada proteína se indica el ratio de expresión obtenido entre las líneas celulares con silenciamiento y sobreexpresión de *CUL4A* y sus controles correspondientes. Los distintos colores de las casillas destacan las proteínas diferencialmente expresadas y hacen referencia a los distintos puntos de corte utilizados; proteínas reprimidas (verde oscuro, ratio<0.8; verde claro ratio<0.7); proteínas sobreexpresadas (naranja oscuro, ratio>1.2; naranja claro, ratio>1.3). (c) Número de cuentas o número de péptidos utilizados para el cálculo del ratio. Se consideraron aquellos valores iguales o mayores a 3. (d) Coeficiente de variación del cálculo del ratio. (e) Procesos biológicos en los que participan las proteínas identificados mediante *Gene Ontology Analysis*. MC: Muerte Celular. PC: Proliferación celular. PM: Proceso Metabólico. RPB: Regulación del Proceso Biológico. RE: Respuesta a Estímulos. HC: Homeostasis Celular. OCB: Organización Celular y Biogénesis. DC: Diferenciación Celular. CMC: Componente del Movimiento Celular. C: Coagulación. D: Desarrollo. T: Transporte. R: Reproducción. DC: División Celular. RD: Respuesta de Defensa. CC: Comunicación Celular. CRC: Crecimiento Celular. Las proteínas diferencialmente expresadas se presentan en cinco listas distintas en función del criterio utilizado para seleccionarlas.

0.77	1.3	Nº acceso <sup>(a)</sup>	Descripción	Gen	HCC1937 SH4/Scrb <sup>(w)</sup>	MDAMB157 SH4/Scrb <sup>(w)</sup>	184B5 SE/Vacío <sup>(w)</sup>	Nº cuentas <sup>(c)</sup>	Coef. de Variación (%) <sup>(d)</sup>	GO/Proceso Biológico <sup>(e)</sup>
0.83	1.2	Lista 1: Proteínas reprimidas en los modelos celulares de silenciamiento y sobreexpresadas en el modelo celular de sobreexpresión								
		Q13619	Cullin-4A	CUL4A	0.38	0.34	3.69	14 / 20 / 14	90,6 / 75,1 / 36,3	MC, PC, PM, RPB, RE
		P02795	Metallothionein-2	MT2A	0.79	0.71	1.35	8 / 11 / 117	5,5 / 7,2 / 19,7	HC, RPB, RE
Lista 2: Proteínas reprimidas en uno de los modelos celulares de silenciamiento (ausencia de dato o de efecto en el otro modelo) y sobreexpresadas en el modelo de sobreexpresión										
		O75367	Core histone macro-H2A.1	H2AFY	#N/A	0.37	1.38	-- / 11 / 23	-- / 16,1 / 14,3	OCB, PM, RPB
		Q01650	Large neutral amino acids transporter small subunit 1	SLC7A5	0.76	1.12	1.26	16 / 16 / 74	6,5 / 5,5 / 10,7	DC, CMC, C, D, PM, RE, T
		P08195	4F2 cell-surface antigen heavy chain	SLC3A2	0.83	1.17	1.23	111 / 68 / 429	5,2 / 9,2 / 11,6	CRC, OCB, CMC, C, PM, RE, T
		P62805	Histone H4	HIST1H4A	0.98	0.44	1.59	166 / 347 / 293	9,7 / 26,3 / 15,8	DC, OCB, D, PM, RPB
		Q9UII2	ATPase inhibitor, mitochondrial	ATPIF1	0.97	0.48	2.42	57 / 26 / 14	10,7 / 26,9 / 79,4	MC, OCB, PC, PM, RPB
		P05114	Non-histone chromosomal protein HMG-14	HMG1	0.85	0.55	1.30	5 / 14 / 5	4,8 / 19,6 / 6,9	PM, RPB
		Q15041	ADP-ribosylation factor-like protein 6-interacting protein 1	ARL6IP1	0.98	0.57	1.69	16 / 20 / 4	3,5 / 20,9 / 10,2	T
		P38159	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein G	RBMX	0.99	0.57	1.24	76 / 54 / 16	9,1 / 23,5 / 7,7	OCB, PM, RPB, RE
		Q15269	Periodic tryptophan protein 2 homolog	PWP2	0.98	0.62	1.33	9 / 6 / 4	5,7 / 8,4 / 18,3	PM, RPB
		Q9Y383	Putative RNA-binding protein Luc7-like 2	LUC7L2	0.98	0.69	1.43	34 / 28 / 36	3,5 / 60,7 / 44,8	
		P98179	Putative RNA-binding protein 3	RBM3	0.94	0.78	1.51	22 / 31 / 26	9,4 / 4,6 / 14,0	PM, RPB, RE
		P30519	Heme oxygenase 2	HMOX2	1.00	0.79	1.29	6 / 8 / 20	6,3 / 13,4 / 18,5	HC, PM, RE, T
		Q07157	Tight junction protein ZO-1	TJP1	1.01	0.81	1.28	63 / 4 / 12	8,5 / 8,8 / 31,8	MC, OCB, D
		P46013	Antigen KI-67	MKI67	0.95	0.81	1.36	79 / 9 / 4	11,4 / 9,2 / 23,2	PC, D, PM, RE
		Q08945	FACT complex subunit SSRP1	SSRP1	0.87	0.81	1.26	44 / 9 / 3	5,2 / 9,5 / 2,0	PM, RPB, R, RE
		Q9UN37	Vacuolar protein sorting-associated protein 4A	VPS4A	0.97	0.82	2.21	7 / 7 / 4	3,2 / 27,0 / 9,0	DC, OCB, PM, T
Lista 3: Proteínas sobreexpresadas en uno de los modelos celulares de silenciamiento (ausencia de dato o de efecto en el otro modelo) y reprimidas en el modelo de sobreexpresión										
		P20591	Interferon-induced GTP-binding protein Mx1	MX1	3.17	#N/A	0.27	5 / -- / 4	5,4 / -- / 19,5	MC, RD, PM, RPB, RE
		Q8IY21	Probable ATP-dependent RNA helicase DDX60	DDX60	1.56	#N/A	0.56	32 / -- / 14	14,6 / -- / 17,5	RE
		Q9Y6K5	2'-5'-oligoadenylate synthase 3	OAS3	1.31	#N/A	0.56	4 / -- / 9	3,9 / -- / 7,3	RD, PM, RPB, R, RE
		Q16831	Uridine phosphorylase 1	UPP1	1.30	#N/A	0.77	24 / -- / 66	6,8 / -- / 15,7	PM
		P05161	Ubiquitin-like protein ISG15	ISG15	1.26	#N/A	0.63	11 / -- / 6	8,3 / -- / 14,1	CC, RD, PM, RPB, RE
		O43175	D-3-phosphoglycerate dehydrogenase	PHGDH	1.25	1.03	0.78	59 / 66 / 39	8,2 / 7,3 / 13,6	DC, OCB, D, PM, RPB, T
		Q8TBC4	NEDD8-activating enzyme E1 catalytic subunit	UBA3	1.24	1.07	0.81	15 / 5 / 20	10,8 / 5,8 / 20,3	PM, RPB, T
		P35579	Myosin-9	MYH9	1.22	#N/A	0.81	419 / -- / 788	8,7 / -- / 17,3	DC, DC, OCB, CMC, D, PM, RE, T
		P35580	Myosin-10	MYH10	1.20	1.14	0.62	8 / 19 / 14	4,4 / 8,4 / 17,2	DC, DC, OCB, PC, CMC, D, PM, RPB, RE, T
		P06865	Beta-hexosaminidase subunit alpha	HEXA	#N/A	1.23	0.79	-- / 8 / 3	-- / 2,2 / 3,6	CC, MC, DC, OCB, HC, D, PM, R, RE
Lista 4: Proteínas reprimidas en ambos modelos de silenciamiento y ausencia de dato o de efecto en el modelo de sobreexpresión										
		P42167	Lamina-associated polypeptide 2, isoforms beta/gamma	TMPO	0.75	0.81	1.13	16 / 28 / 11	15,6 / 9,8 / 18,8	PM, RPB
		Q52LW3	Rho GTPase-activating protein 29	ARHGAP29	0.77	0.83	#N/A	23 / 6 / --	8,3 / 10,5 / --	CC, PM, RPB
		P17096	High mobility group protein HMG-I/HMG-Y	HMG1	0.77	0.28	1.10	38 / 5 / 29	7,7 / 26,8 / 9,0	OCB, PC, PM, RPB, R, RE
		P31689	DnaJ homolog subfamily A member 1	DNAJA1	0.79	0.79	1.18	84 / 62 / 43	12,4 / 27,8 / 27,9	CMC, PM, R, RE
		Q9NPL8	Transmembrane protein C3orf1	C3orf1	0.79	0.83	#N/A	18 / 9 / --	37,8 / 9,9 / --	T
Lista 5: Proteínas sobreexpresadas en ambos modelos de silenciamiento y ausencia de dato o de efecto en el modelo de sobreexpresión										
		P02765	Alpha-2-HS-glycoprotein	AHSG	2.38	1.58	#N/A	20 / 35 / --	10,7 / 4,3 / --	CC, CRC, OCB, RD, D, PM, RPB, R, RE, T
		P30501	HLA class I histocompatibility antigen, Cw-2 alpha chain	HLA-C	1.63	1.38	#N/A	15 / 5 / --	4,0 / 9,0 / --	CMC, RPB, RE
		Q9Y2J8	Protein-arginine deiminase type-2	PADI2	1.47	1.29	#N/A	10 / 11 / --	5,8 / 3,6 / --	PM
		P09493	Tropomyosin alpha-1 chain	TPM1	1.45	1.31	#N/A	26 / 34 / --	13,2 / 7,4 / --	DC, OCB, CMC, D, PM, RPB, RE, T
		Q15533	Tapasin	TAPBP	1.34	1.22	#N/A	17 / 20 / --	9,1 / 16,8 / --	OCB, PM, RE, T
		Q7Z406	Myosin-14	MYH14	1.31	1.27	#N/A	68 / 5 / --	14,7 / 16,5 / --	DC, OCB, D, PM, RE, T
		Q13586	Stromal interaction molecule 1	STIM1	1.28	1.21	#N/A	7 / 10 / --	8,3 / 9,8 / --	OCB, C, PM, RPB, RE, T
		P28065	Proteasome subunit beta type-9	PSMB9	1.26	1.42	#N/A	10 / 5 / --	12,4 / 3,2 / --	MC, PM, RPB, RE
		Q9UKV8	Protein argonaute-2	EIF2C2	1.23	1.21	#N/A	28 / 13 / --	8,8 / 4,6 / --	PM, RPB, RE

### 2.4.3. MT2A: Validación resultados de iTRAQ mediante WB

Para validar con una técnica diferente de iTRAQ la represión y sobreexpresión de MT2A observadas al silenciar y sobreexpresar *CUL4A*, respectivamente, se realizaron WBs en los distintos modelos celulares utilizando un anticuerpo monoclonal anti-MT2A.

En la línea 184B5 con sobreexpresión de *CUL4A* se detectó la proteína MT2A en mayor abundancia que en la línea control. La expresión normalizada de la proteína fue 5.4 veces superior a la detectada en las células control (Figura 24) lo que apoyaría los resultados derivados de iTRAQ. Sin embargo, en las líneas HCC1937 y MDA-MB-157 no fue posible detectar MT2A por lo que los inmunoblots no permitieron contrastar los resultados de expresión diferencial observados mediante iTRAQ. El conteo de péptidos de MT2A obtenido con iTRAQ apuntaría a una baja abundancia de esta proteína en ambas líneas (en la línea HCC1937 se contaron ocho veces los péptidos de MT2A y en la línea MDA-MB-157 once veces comparados con las 117 contabilizaciones en la línea 184B5). Por otra parte el pequeño tamaño de la proteína y la limitada sensibilidad del anticuerpo (se tuvo que emplear una dilución muy concentrada del mismo) también contribuirían a explicar este resultado.

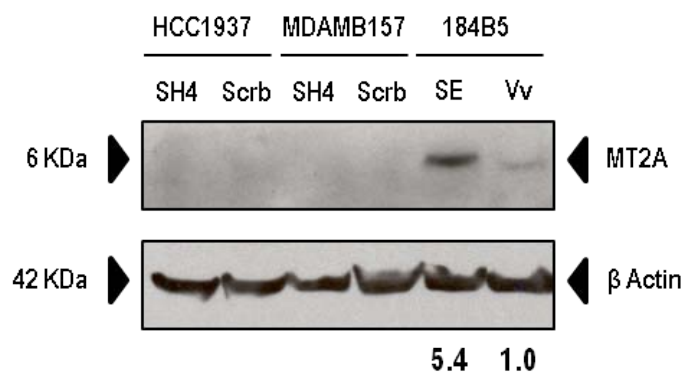


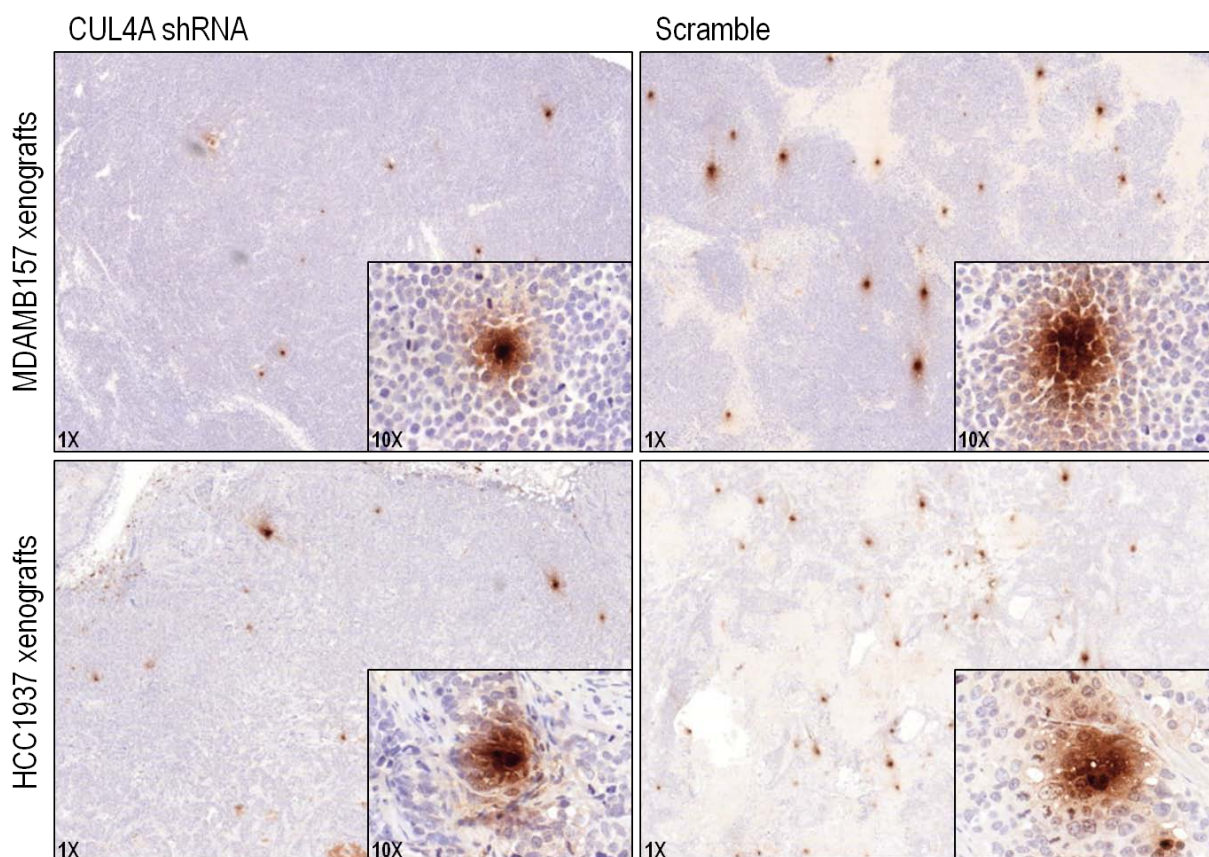
Figura 24. Detección de la expresión de MT2A mediante WB en los modelos celulares estudiados por medio de iTRAQ. La expresión de MT2A se evaluó mediante WB y se normalizó con la expresión de la proteína endógena ( $\beta$ -actina, ACTB). Se muestra la banda detectada a la altura de 6 KDa coincidente con el peso molecular de la proteína en la línea 184B5 (sobreexpresión, SE; y Vector vacío, Vv). Los números en la parte inferior de la imagen indican el valor de la intensidad de MT2A para la línea celular 184B5 normalizado con el valor de la intensidad de  $\beta$ -actina.

#### 2.4.4.MT2A: Validación resultados de iTRAQ mediante IHQ en los xenotrasplantes derivados de las líneas tumorales

Como alternativa para validar la represión de MT2A asociada con el silenciamiento de *CUL4A* en las líneas tumorales, se analizó la expresión de la proteína mediante inmunohistoquímica en los xenotrasplantes derivados de las líneas HCC1937 y MDA-MB-157 con silenciamiento de *CUL4A* (y en sus respectivos controles).

Se obtuvo un patrón de expresión particular para la proteína MT2A en los xenotrasplantes analizados. Panorámicamente se observan cúmulos de tinción que se corresponden con grupos de células positivas para la expresión de MT2A. En estos grupos de células llama la atención el gradiente de intensidad del marcaje, con la presencia de un pequeño número de células centrales intensamente teñidas a partir de las cuales la tinción disminuye gradualmente de intensidad. Tanto en las células más intensamente teñidas como en las que no la tinción es nuclear y citoplasmática.

El número de focos de tinción de MT2A fue menor en las células tumorales con silenciamiento del gen que en sus respectivos controles. No obstante, para realizar una mejor valoración de la asociación de la expresión de *CUL4A* con la de MT2A se analizó la tinción de ambos marcadores en paralelo.



**Figura 25. Tinción inmunohistoquímica de MT2A en las células tumorales derivadas de xenotrasplante.** Los tumores originados por la inyección de las células MDA-MB-157 (silenciamiento y control) y HCC1937 (silenciamiento y control) en las mamas de ratones inmunodeprimidos se embebieron en parafina y se tiñeron mediante inmunohistoquímica para mostrar la expresión de MT2A. Se muestran imágenes representativas de las tinciones de MT2A en los xenotrasplantes derivados de las células HCC1937 silenciadas (a, CUL4A shRNA) y control (b, Scramble) y de las células MDA-MB-157 silenciadas (c, CUL4A shRNA) y control (d, Scramble). Las imágenes se corresponden con campos con 1X y 10X aumentos, recuadro grande e inserto, respectivamente.





# Discusión



## 1. *CUL4A* Y *TFDP1* SON GENES CANDIDATOS A SER DIANA DE LA AMPLIFICACIÓN 13q34 EN CÁNCER DE MAMA

En trabajos previos del grupo se identificó una región de amplificación en 13q34 que aparecería en el 4.5% del conjunto de tumores de mama esporádicos y familiares y cuya frecuencia incrementaría en los tumores BRCA1 (8%) o aquellos de fenotipo basal (en torno a un 20%) (Melchor *et al.*, 2008; Melchor *et al.*, 2009). El análisis detallado de los tumores de mama que presentaron la aberración genómica permitió la definición de una región mínima y común de amplificación de 1.83 Mb (Melchor *et al.*, 2009).

Con estos antecedentes como punto de partida del presente trabajo de doctorado y con el propósito de identificar el posible gen o genes diana de la amplificación 13q34, se ha continuado con el estudio molecular de los genes incluidos en la región mínima de amplificación. Los resultados derivados de los experimentos de RT-qPCR e inmunohistoquímica señalaron a *CUL4A* y *TFDP1* como genes candidatos a ser diana de la amplificación 13q34. Se encontró una correlación positiva y significativa entre la presencia de la amplificación y los niveles de expresión génica y proteica de *CUL4A* y *TFDP1*, es decir, el número de copias determinaría en gran medida los niveles de expresión de ambos genes, independientemente de la existencia de otros mecanismos reguladores de la expresión de los mismos (Melchor *et al.*, 2009).

Cabe decir que aunque actualmente son 26 los genes identificados en la región mínima de amplificación, en el momento de iniciar el presente trabajo se describían 22. De estos 22 genes, debido a limitaciones en la disponibilidad de material, se seleccionaron once (*ARHGEF7*, *ATP11A*, *MCF2L*, *CUL4A*, *LAMP1*, *GRTP1*, *DCUN1D2*, *TFDP1*, *GAS6*, *RASA3* y *CDC16*) relacionados con el proceso tumoral o la transformación celular de acuerdo con estudios previos o su función hipotética. Por lo tanto no se puede descartar el posible papel en la carcinogénesis de los genes no incluidos en nuestro análisis, o bien la de los que se incluyeron pero no llegaron a alcanzar significación estadística en este estudio aún presentado cierta asociación entre sus niveles de expresión y la existencia amplificación (como por ejemplo *ARHGEF7* y *ATP11A*). Sin embargo, del conjunto de genes analizados, *CUL4A* y *TFDP1* fueron los dos únicos que mostraron una expresión significativamente determinada por el número de copias existentes a nivel genómico, premisa necesaria para considerar a un gen candidato a ser la diana de una región de amplificación.

CUL4A forma parte de las culinas, familia de proteínas que no tienen actividad catalítica intrínseca pero que facilitan el ensamblaje de los distintos componentes que constituyen las ligasas de ubiquitina de tipo RING o CRLs (*Cullin-RING ubiquitin ligases*). Las CRLs integran la familia más numerosa de ligasas de ubiquitina (E3), complejos multiproteicos que regulan un amplio rango de funciones celulares. La unión covalente de moléculas de ubiquitina a las diferentes proteínas diana altera su función, bien de forma no proteolítica, o más frecuentemente marcándolas para degradación proteosomal. Dada la variedad de sustratos este proceso regula un amplio abanico de rutas celulares. En mamíferos se conocen 8 culinas diferentes, CUL1, 2, 3, 4A, 4B, 5, 7 y PARC (Lee and Zhou, 2010; Sarikas *et al.*, 2011). En concreto CUL4A interacciona en su extremo terminal con la proteína RING finger RBX1/ROC1/Hrt1 para reclutar a la enzima conjugadora de ubiquitina (E2) y en su extremo N terminal interacciona con la proteína adaptadora DDB1 a la que se unen los DCAFs o factores asociados a DDB1 y CUL4A (*DDB1-CUL4A-associated factors*) (Figura 1A). Los DCAFs actúan como receptores de los distintos sustratos y son los que determinan las actividades específicas y los diferentes procesos regulados por CUL4A que incluyen, entre otros, proliferación, diferenciación, apoptosis, reparación del daño en el DNA o remodelación de la cromatina (Figura 1B) (Angers *et al.*, 2006; He *et al.*, 2006; Higa *et al.*, 2006a; Jin *et al.*, 2006).

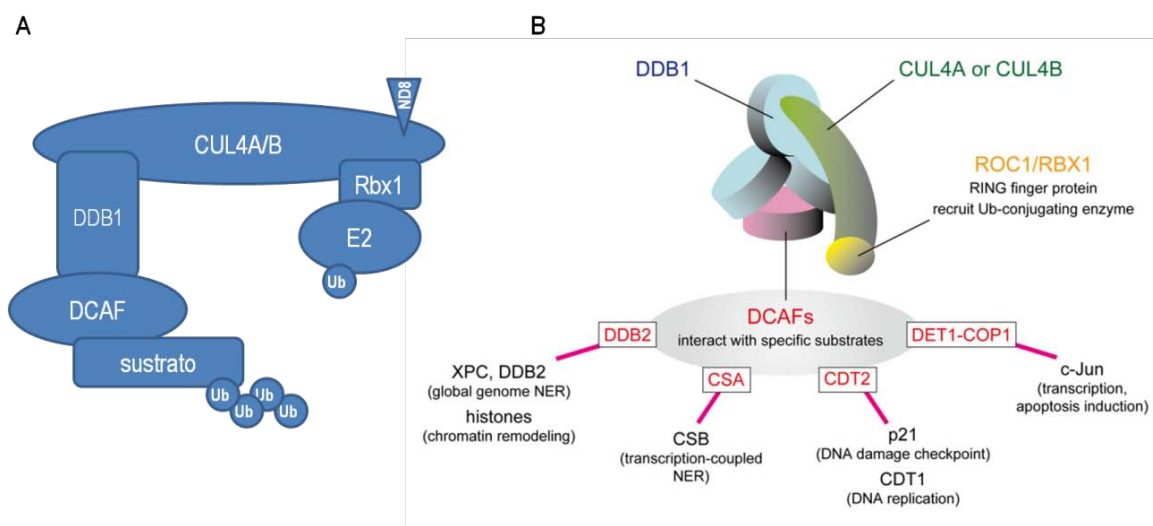


Figura 1. Diagrama esquemático del complejo multimérico CRL ubiquitina ligasa.

TFDP1 es miembro de una familia de factores de transcripción que forma heterodímeros con proteínas de la familia E2F. Su función consiste en potenciar la actividad de unión al DNA y promover la transcripción de los genes diana de las proteínas E2F (Girling *et al.*, 1993). Los

complejos TFDP1/E2F1 controlan la actividad transcripcional de numerosos genes involucrados en la progresión del ciclo celular, como son ciclina A, ciclina E y CDK2, que median la transición de G1 a S y, por lo tanto, son partícipes activos del control de la proliferación celular (Shan *et al.*, 1996). A su vez la actividad transcripcional del complejo es inhibida mediante la asociación de la proteína supresora de tumores de retinoblastoma (pRB) o de las proteínas relacionadas p107 y p130 (Helin *et al.*, 1993; Wu *et al.*, 1995).

Además de la estrecha relación observada entre la amplificación y la sobreexpresión de *CUL4A* y *TFDP1* ( $\geq 75\%$  de los tumores con amplificación sobreexpresaron uno o ambos genes) también encontramos, aunque en menor porcentaje, un grupo de tumores de mama sin la amplificación 13q34 que sobreexpresaban notablemente estos genes (Melchor *et al.*, 2009). Este hecho podría ser el reflejo de la existencia de otros mecanismos moleculares diferentes a la amplificación de DNA que estén favoreciendo su sobreexpresión. Estos resultados estarían en conformidad con el hecho de que la sobreexpresión de muchos oncogenes es un evento más generalizado que su amplificación. Este mecanismo se ha descrito con anterioridad y sería el caso, por ejemplo, de la proteína Ciclina D1 codificada por gen *CCND1* cuya sobreexpresión se asocia con la amplificación del gen pero también por la expresión del receptor de estrógeno en cáncer de mama (Wilkerson and Reis-Filho, 2012). El aumento de los niveles de *CUL4A* y *TFDP1* en los tumores primarios de mama apoyaría su requerimiento en el proceso tumoral; asimismo, su sobreexpresión en independencia de la amplificación reforzaría su posible papel como oncogenes en cáncer de mama, ya que células con ganancia de función en estos genes, independientemente del mecanismo subyacente, se seleccionarían en la carcinogénesis.

La sobreexpresión de *CUL4A* y/o *TFDP1*, asociada a la amplificación 13q34 en cáncer de mama, se ha descrito con anterioridad por otros grupos de investigación aunque esta relación se ha establecido mediante aproximaciones diferentes. Por ejemplo Chen y colaboradores detectaron mediante *Northern blot* y *Southern blot* sobreexpresión y amplificación de *CUL4A* en líneas celulares humanas de cáncer de mama y tras analizar la sobreexpresión del gen por medio de hibridación *in situ* de RNA en tumores primarios de cáncer de mama sugirieron un posible papel de *CUL4A* en la carcinogénesis (Chen *et al.*, 1998). En otro trabajo centrado en tumores de mama desarrollados en modelos de ratón nulos para p53, se describe la amplificación y sobreexpresión de los genes *Ing1*, *Cul4a*, *Lamp1*, *Tfdp1* y *Gas6* localizados en la región cromosómica de ratón 8A1 *synténica* a la región 13q34 en humanos. Tras el análisis de la frecuencia de amplificación de los cuatro genes en carcinomas de mama humanos y la

incorporación de datos públicos de expresión génica y clínicos se propone que la sobreexpresión de *CUL4A*, *LAMP1*, *GAS6* y en particular de *TFDP1* puede ser relevante para el desarrollo y/o progresión del cáncer de mama (Abba *et al.*, 2007). Posteriormente, en 2010, Turner y colaboradores, caracterizaron 56 tumores de mama triple negativos integrando los resultados de aCGH de alta resolución y de expresión génica con el objetivo de buscar genes que pudiesen ser potenciales dianas terapéuticas basándose en su consistente sobreexpresión cuando están amplificados. De esta forma identifican la amplificación en la región 13q33.3-13q34 en el 5% de los casos estudiados y entre los 14 genes que proponen como diana/s se encuentra *CUL4A*, aunque no *TFDP1*.

Existen otros trabajos de investigación en los que se asocia la amplificación 13q34 con otros tipos tumorales diferentes de cáncer de mama (Castillo *et al.*, 2010; Salgado *et al.*, 2010; Shinomiya *et al.*, 1999; Yasui *et al.*, 2002). Un estudio llevado a cabo en adenocarcinoma de esófago sugiere el gen *TFDP1* como diana de la amplificación (Shinomiya *et al.*, 1999). En carcinoma hepatocelular se concluye que los genes diana más plausibles son *CUL4A*, *TFDP1* y *CDC16* (Yasui *et al.*, 2002). Más recientemente en cáncer de pulmón se propone *TFDP1* como gen candidato (Dohna *et al.*, 2000; Michiels *et al.*, 2002; Shinomiya *et al.*, 1999; Yasui *et al.*, 2002).

Los resultados obtenidos en el presente trabajo irían en consonancia con los trabajos que sugieren *CUL4A* y *TFDP1* como posibles genes diana de la amplificación 13q34. En particular nuestros datos apoyan su potencial implicación en cáncer de mama. Cabe destacar que esta es la primera caracterización del amplicón 13q34 en tumores primarios de cáncer de mama que ofrece un análisis completo de los posibles genes candidatos mediante el estudio en tres niveles de complejidad: DNA, RNA y proteínas.

Respecto a las asociaciones halladas entre la amplificación en 13q34 y la expresión de diferentes marcadores inmunohistoquímicos, encontramos que la amplificación en 13q34 se asocia con un alto grado histológico, ausencia de expresión de receptores hormonales y sobreexpresión de citoqueratinas basales, activadores del ciclo celular y de EGFR, entre otros marcadores. Estos hallazgos sugieren que la amplificación es un evento importante en el desarrollo y/o progresión de los tumores de fenotipo basal lo que estarían en consonancia con los resultados previos del grupo que señalaban que dicha alteración sería un evento recurrente en este grupo de tumores (Melchor *et al.*, 2008). Estos datos tienen un particular interés dado

que tumores del fenotipo basal constituyen un reto a nivel clínico dada la mala evolución de las pacientes que lo padecen debido a que sufren recaídas tempranas y presentan bajas tasas de supervivencia. A diferencia de los tumores luminales que expresan el receptor de estrógenos o los tumores HER2-positivos, el subtipo basal típicamente pierde la expresión de las dianas moleculares que confieren sensibilidad a terapias dirigidas que, por otra parte, son altamente efectivas. Estas dianas son el receptor de estrógenos que determina el tratamiento con tamoxifen e inhibidores de la aromatasa y la amplificación y/o sobreexpresión de HER2 hacia la que se dirige el tratamiento con el anticuerpo monoclonal trastuzumab que se une a específicamente a este receptor inhibiendo la proliferación de las células tumorales (Schneider *et al.*, 2008; Yehiely *et al.*, 2006). Debido a la ausencia de dianas moleculares validadas en los tumores basales, la quimioterapia convencional, que típicamente incluye antraciclinas como la doxorubicina que producen daño en el DNA o taxanos que estabilizan los microtúbulos bloqueando la mitosis son la única opción terapéutica para mujeres con estos tumores de peor pronóstico. Además, la toxicidad de estos agentes produce efectos secundarios que limitan la dosis.

Aunque no hay un solapamiento completo, la mayor parte de los tumores BRCA1 presentan características clinicomorfológicas y patrones inmunohistológicos y de expresión génica similares a los descritos en los tumores de fenotipo basal y por lo tanto comparten la problemática descrita anteriormente (Foulkes *et al.*, 2004; Foulkes *et al.*, 2003; Palacios *et al.*, 2005; Stefansson *et al.*, 2009). Aunque uno de los avances más recientes en medicina translacional en el campo de la investigación en cáncer es el concepto de letalidad sintética y la aplicación de los inhibidores de PARP para el tratamiento de los tumores BRCA1, y en general de los tumores con disfunción en la ruta de reparación del DNA por recombinación homóloga (Ashworth, 2008), la definición de alteraciones moleculares relevantes y específicas en estos tumores es fundamental para el desarrollo de terapias dirigidas que permitan incrementar las oportunidades terapéuticas y mejorar pronóstico de las pacientes diagnosticadas con este tipo de tumores.

De confirmarse la mayor incidencia de la amplificación 13q34 en los tumores BRCA1 y en general en los tumores de mama de fenotipo basal, esta aberración genómica podría usarse como marcador clínico y como potencial diana terapéutica para al menos un porcentaje de estos tumores. Para ello es fundamental la definición del gen o genes diana de la amplificación a cuya sobreexpresión (ganancia de función) serían adictas, y por lo tanto dependientes, las células

tumorales (Weinstein and Joe, 2006). Un paso en esta dirección sería la caracterización del papel desempeñado por *CUL4A* y *TFDP1* en cáncer de mama en general y en particular en el grupo de tumores del subtipo basal y/o BRCA1. Por otra parte, con independencia de la amplificación, nuestros resultados indican que los elevados niveles de expresión de proteína de *CUL4A* y *TFDP1* se asocian con marcadores relacionados con malignidad y peor pronóstico de la enfermedad lo que corroboraría la relevancia de ambos genes desde el punto de vista clínico (Melchor *et al.*, 2009). Estos resultados estarían en consonancia con un trabajo previo en el que mediante el uso de un anticuerpo anti CUL4 (no específico de *CUL4A*) se describe la asociación entre la expresión de este marcador y la peor evolución de pacientes con cáncer de mama (Schindl *et al.*, 2007).

Pese al interés de ambos genes candidatos debido al tiempo limitado para la ejecución del presente proyecto y al mayor número de evidencias vinculando *CUL4A* con el cáncer de mama (Chen *et al.*, 1998; Schindl *et al.*, 2007; Turner *et al.*, 2010a) tan solo se continuó con el estudio funcional *in vitro* e *in vivo* del posible papel oncogénico de *CUL4A* en cáncer de mama.

## **2. LA MODULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE CUL4A MODIFICA LA VIABILIDAD CELULAR *IN VITRO* E *IN VIVO***

Como se ha descrito previamente la ubiquitina ligasa *CUL4A* orchestra un amplio abanico de mecanismos reguladores celulares. Entre las consecuencias del funcionamiento erróneo o la perturbación del intrincado balance de las rutas celulares en las que participa esta enzima se encontraría el desencadenamiento de la transformación maligna y la tumorigénesis. Es importante resaltar que las culinas pueden actuar como oncoproteínas o supresores tumorales ya que su efecto en oncogénesis lo dictan bien sus receptores de sustrato o sus correspondientes sustratos. Existen múltiples mecanismos indirectos mediante los cuales las culinas contribuyen a con la carcinogénesis (Lee and Zhou, 2010).

La sobreexpresión de *CUL4A* en distintos tipos de tumores ha llevado a plantear la hipótesis de que *CUL4A* puede desempeñar un papel oncogénico (Hung *et al.*, 2011; Ren *et al.*, 2012; Yasui *et al.*, 2002). A pesar de que la amplificación y/sobreexpresión de *CUL4A* se ha descrito en cáncer de mama (Chen *et al.*, 1998; Schindl *et al.*, 2007; Turner *et al.*, 2010a), no se ha caracterizado en profundidad su posible implicación en el proceso carcinogénico en este tipo de tumores. Por ello en el presente trabajo se ha llevado a cabo la caracterización de *CUL4A* a



través de la sobreexpresión y silenciamiento del gen en distintos modelos celulares de mama y con un abordaje tanto *in vitro* como *in vivo*. Mediante la sobreexpresión de *CUL4A* en modelos celulares no transformados con bajos niveles de expresión del gen se pretendió estudiar su capacidad para inducir el fenotipo tumoral y estudiar su posible participación en los eventos iniciales de la carcinogénesis. Por otra parte, mediante el silenciamiento de *CUL4A* en modelos celulares tumorales que presentan amplificación y/o sobreexpresión del gen se quiso estudiar su implicación en la progresión tumoral y en la adquisición de un fenotipo más agresivo por parte de las células tumorales.

Debido a la complejidad y heterogeneidad que existe en cáncer de mama es difícil encontrar un modelo que recapitule todos los aspectos de la enfermedad. No obstante se consideró fundamental seleccionar líneas celulares que se ajustasen en gran medida a las características observadas en los tumores primarios de mama que presentan amplificación y/o sobreexpresión del gen *CUL4A* con el objetivo de representar de la forma más fehaciente el entorno celular que favorece su acción. De este modo se determinó la idoneidad de las líneas de cáncer de mama con fenotipo basal que sobreexpresan *CUL4A*, HCC1937 y MDAMB157, la primera derivada de un tumor de una portadora de mutación en el gen *BRCA1* y la segunda derivada de un tumor esporádico con amplificación en 13q34. Asimismo se seleccionó la línea celular de mama inmortalizada pero no transformada 184B5.

La sobreexpresión exógena de *CUL4A* en la línea celular 184B5 fue capaz de inducir una mayor proliferación celular asociada con un incremento en la síntesis de DNA. Asimismo aumentó la capacidad de estas células para formar colonias en condiciones tanto dependientes como independientes de anclaje. En concordancia con nuestros resultados se conoce que la expresión ectópica de *CUL4A* aumenta el crecimiento independiente de anclaje de las células epiteliales de mama inmortalizada pero no transformada MCF10A (Gupta *et al.*, 2002). Además, aunque en otros modelos tumorales distintos del cáncer de mama, también se ha descrito que la sobreexpresión del gen promueve la formación de colonias en *soft agar* en líneas tumorales de mesotelioma pleural maligno (Hung *et al.*, 2011) y en células epiteliales de próstata humana inmortalizadas no tumorales (Ren *et al.*, 2012), lo que da consistencia a nuestros resultados y a la posible implicación de *CUL4A* en el proceso tumoral.

En las células 184B5 control se observó cierto porcentaje de células poliploides, no obstante este porcentaje incrementó al sobreexpresar *CUL4A* y además se constató que las células

poliploides eran capaces de entrar en fase de síntesis. La tetraploidización y poliploidía como consecuencia del estrés producido por la expresión de un oncogén es un evento bien documentado en cáncer (Storchova and Pellman, 2004). En relación a la sobreexpresión de *CUL4A*, no hay evidencias funcionales previas que la relacionen con la replicación de células poliploides. En 2002, Gupta y colaboradores observan células multinucleadas en la línea MCF10A al sobreexpresar el gen, relacionan este fenómeno con un fallo en el punto de control G2/M (Gupta *et al.*, 2002). Nuestros resultados podrían explicarse por la interrupción del punto de control de tetraploidía que existe en G1. Así, las células que debido a errores en la mitosis tras una primera ronda de replicación llegasen a G1 con un contenido de DNA tetraploide, en condiciones normales (células control) quedarían retenidas en el punto. Sin embargo la sobreexpresión de *CUL4A*, permitiría eludir este control de manera que estas células entrarían en ciclo y aumentaría la población celular  $>4N$ . Se ha propuesto que poblaciones de células aneuploides cancerosas pueden en parte desarrollarse a través de células intermediarias tetraploides. La inactivación del checkpoint de tetraploidía daría lugar a mitosis catastróficas que originarían inestabilidad genómica, y finalmente generarían células aneuploides (Storchova and Pellman, 2004). Para verificar la implicación de *CUL4A* en este aspecto del proceso tumoral serían necesarios estudios adicionales. En concreto el análisis de ciclo celular y síntesis de DNA en células control y con sobreexpresión de *CUL4A* tras someterlas a radiación ultravioleta ayudaría a clarificar la participación de *CUL4A* en este punto.

A pesar de estas evidencias transformadoras obtenidas en experimentos *in vitro* la sobreexpresión del gen *CUL4A* no fue suficiente para dotar a las células 184B5 de la capacidad de formar tumores *in vivo* al ser injertadas en las mamas de ratones inmunodeprimidos. Estos datos indicarían que la sobreexpresión de *CUL4A* por sí sola no conferiría habilidad para iniciar el proceso tumoral, si bien es importante resaltar la dificultad que confiere transformar células epiteliales de mama humana en contraposición con lo que ocurre con los fibroblastos embrionarios de ratón (Sun and Taneja, 2007). Por otra parte los genes candidatos a ser partícipes en el proceso tumoral pueden exhibir su implicación a través de la regulación de diferentes aspectos de la biología del cáncer (Hanahan and Weinberg, 2011) y es posible que en los tumores la sobreexpresión de *CUL4A* coopere con otros genes en el inicio de la carcinogénesis. En ensayos *in vitro* se observó el aumento de la capacidad para crecer en medio semisólido de las células que coexpresaron *CUL4A* y *H-Ras-V12* lo que podría ser un reflejo de la cooperación entre *CUL4A* y *H-Ras-V12* o de la generación por parte de *H-Ras-V12* de un ambiente más propicio para la acción de *CUL4A*. En relación a esta premisa, no existen estudios

funcionales previos en los que se estudie la relación de *CUL4A* con otros oncogenes implicados en el proceso tumoral en general o en cáncer de mama en particular aunque c-Myc y H-Ras-V12 se utilizan con frecuencia en el estudio de posibles cooperaciones entre oncogenes (Gstaiger *et al.*, 2001; Moon *et al.*, 2000) y la transformación de células epiteliales de mama humanas (Elenbaas *et al.*, 2001).

La amplificación y sobreexpresión de c-Myc es un evento común en cáncer de mama, en concreto, parece estar asociado a los tumores de mama de fenotipo basal donde se ha observado su amplificación en un 40% de los casos (Chandriani *et al.*, 2009; Network, 2012). Con la sobreexpresión exógena de c-Myc en las células 184B5 se intentó representar la amplificación del gen que ocurre de manera natural en los tumores de mama humanos, sin embargo, *CUL4A* no parece colaborar significativamente con este tipo de alteraciones. Por otra parte, aunque las mutaciones en *RAS* no son frecuentes en cáncer de mama, existen evidencias que sugieren que la mayoría de los tumores de mama tienen alteraciones de la ruta de señalización de *Ras* (Clark and Der, 1995), además se conoce que la expresión ectópica de *H-Ras-V12* favorece la adquisición de una señal mitogénica constitutiva que favorece la transformación de células epiteliales de mama (Elenbaas *et al.*, 2001). Y, es posible que este aspecto beneficie las capacidades oncogénicas de *CUL4A*.

El estudio de otros oncogenes involucrados en el desarrollo del cáncer de mama que mostraron una asociación con la sobreexpresión de *CUL4A* en la caracterización de los tumores primarios aportaría más información sobre la participación del gen en el proceso tumoral. En este sentido, sería interesante estudiar la posible cooperación de *CUL4A* con EGFR, P-Cadherin, CCNB1, SKP2 o CK5.

Tan solo existe un trabajo *in vivo* que estudia la sobreexpresión de *CUL4A* en ratones transgénicos. Los autores no inducen la expresión del gen en tejido mamario pero observan que tras la inducción de la expresión del gen en los pulmones de los ratones se generan regiones de hiperplasia en diferentes puntos de este órgano lo que apoyaría la implicación de la sobreexpresión de *CUL4A* en la promoción de una proliferación incontrolada (Li *et al.*, 2011).

Respecto a los resultados del presente trabajo derivados del silenciamiento estable de *CUL4A* en las líneas celulares tumorales de mama MDAMB157 y HCC1937 que sobreexpresan el gen (con o sin amplificación en 13q34, respectivamente) se observó una reducción de la

proliferación celular y una disminución del porcentaje de células en la fase de síntesis de DNA. Además el silenciamiento de *CUL4A* disminuyó la capacidad para formar colonias tanto en condiciones dependientes como independientes de anclaje y en experimentos *in vivo* el silenciamiento del gen redujo la tasa de crecimiento de los tumores generados por las dos líneas tumorales. Nuestro resultado en tejido mamario se verían apoyados por los obtenidos por otros grupos en los que el silenciamiento de *CUL4A* reduce la capacidad de las células mesotelioma pleural maligno (Hung *et al.*, 2011) y de cáncer de próstata (Ren *et al.*, 2012) para crecer en *soft agar* y disminuye la tasa de crecimiento de los tumores generados por éstas últimas (Ren *et al.*, 2012).

Es importante destacar que, en contraposición a lo observado en las células tumorales HCC1937 y MDA-MB-157 que sobreexpresan *CUL4A*, el silenciamiento de *CUL4A* en las células 184B5 immortalizadas pero no tumorales no redujo su viabilidad. Y, es que, a pesar de las diferentes anormalidades genéticas y epigenéticas que portan las células HCC1937 y MDA-MB-157 los resultados obtenidos apoyarían la dependencia que estas células tumorales habrían desarrollado a la continuada expresión de *CUL4A* para el mantenimiento de su estado neoplásico. En cáncer de mama este estado de adicción oncogénica se ha descrito tanto en tumores como en líneas celulares para los genes de *c-MYC* y *WNT* (Weinstein and Joe, 2008) y, sobre todo, para *HER2* cuya adicción oncogénica se trata actualmente con éxito en la clínica mediante el uso de anticuerpos o moléculas inhibitoras (Rahman *et al.*, 2007; Torti and Trusolino, 2011; Weinstein and Joe, 2008). El papel de un oncogén en células cancerígenas puede ser más esencial y cualitativamente diferente que en células normales. Por lo tanto, las células tumorales pueden ser mucho más dependientes de la actividad de ese oncogén específico que las células normales (Weinstein, 2002). Es posible que las células que durante el proceso tumoral hayan adquirido la persistente expresión de *CUL4A* sean más dependientes de sus acciones que las células normales, además puede ocurrir que en células normales la ausencia de *CUL4A* pueda ser suplida por otro gen con funciones similares como podría ser el caso de *CUL4B* que se ha descrito que en algunas circunstancias sus funciones son redundantes (Liu *et al.*, 2009) aunque nunca se le ha encontrado sobreexpresado en cáncer ni relacionado con el proceso tumoral (Lee and Zhou, 2012). Debido a que los altos niveles de la proteína delimitan un tipo de tumores de mama de comportamiento más agresivo el uso de drogas dirigidas hacia la actividad de *CUL4A* podrían, por lo tanto, actuar selectivamente contra células cancerígenas que sobreexpresen el gen sin afectar a las células normales.

Actualmente, la única intervención terapéutica aprobada por la FDA basada en la maquinaria de la ubiquitina es la inhibición de la subunidad 20S del proteosoma mediante el fármaco Bortezomib en el tratamiento de mieloma múltiple y linfomas de células del manto (Fulda *et al.*, 2012). Además, se han desarrollado otras moléculas de efecto más dirigido como son inhibidores de la acción de NEDD8 o de la proteína MDM2 pero que aún se encuentran en la primera fase de los ensayos clínicos (Fulda *et al.*, 2012).

### **3. *CUL4A* REGULARÍA LA VIABILIDAD Y PROLIFERACIÓN DE LAS CÉLULAS MAMARIAS A TRAVÉS DE LA DEGRADACIÓN DE P21, P27 Y P53**

Se estima que el abanico de sustratos ubiquitinados por *CUL4A* es más amplio de lo que se conoce, sobretodo en relación al cáncer (Lee and Zhou, 2012). Sin embargo son numerosas las proteínas cuya regulación por *CUL4A* ha sido ya descrita y cuya participación en diferentes funciones celulares está bien establecida (Higa *et al.*, 2006b; Kim *et al.*, 2008; Nag *et al.*, 2004; Nishitani *et al.*, 2008).

Respecto a dianas conocidas de *CUL4A* se encuentran los inhibidores de las quinasas dependientes de ciclinas p21 y p27 (Higa *et al.*, 2006b; Nishitani *et al.*, 2008). Dado su papel regulador del ciclo celular parecían obvios candidatos a mediar los fenotipos relacionados con la proliferación y viabilidad celular observados en los modelos celulares de sobreexpresión y silenciamiento de *CUL4A* y por ello analizó su expresión. Puesto que *CUL4A* marca p21 y p27 para degradación vía proteosomal (Higa *et al.*, 2006b; Nishitani *et al.*, 2008), se esperaría una reducción en los niveles de ambas proteínas con la sobreexpresión del gen y, por el contrario, la acumulación de las mismas con su silenciamiento. La reducción y acumulación de estas moléculas que bloquean la progresión del ciclo celular explicarían el aumento y disminución de la proliferación observadas respectivamente al sobreexpresar y silenciar *CUL4A*.

En relación a la sobreexpresión de *CUL4A*, no se apreció una modificación sustancial de la tasa de degradación de p21 y p27 una vez inhibida la síntesis proteica con cicloheximida por lo que, en principio, el incremento de viabilidad observado con la sobreexpresión de *CUL4A* las células 184B5 no podría explicarse a través de la regulación de estas moléculas. Estos resultados se encontrarían en contraposición con hallazgos previos en los que se observa una

mayor tasa de degradación para estas proteínas con la sobreexpresión del gen (Gupta *et al.*, 2002; Hung *et al.*, 2011). Dado que está ampliamente establecido que p21 y p27 están reguladas, en parte, por *CUL4A* es posible que dependiendo de la línea celular en la que se estudien los niveles basales existentes de la proteína y su tasa de degradación varíe, pudiendo ocurrir que en la línea 184B5, se necesite bloquear durante más tiempo la inhibición de la síntesis proteica (ampliando los tiempos de tratamiento con cicloheximida) para observar efectos en la degradación mediada por *CUL4A*.

Además de su relación con p21 y p27 también se ha descrito que *CUL4A* participaría en la degradación proteolítica de p53 mediada por MDM2 (Nag *et al.*, 2004). Continuando con el objetivo de explicar el aumento de la proliferación observado en la línea 184B5 al sobreexpresar *CUL4A*, y en particular el incremento de células 184B5 poliploides en fase de síntesis del ciclo celular, se analizaron los niveles de p53. En la inmunodetección por Western Blot se halló una menor expresión de dicha proteína en las células con sobreexpresión de *CUL4A* respecto a las células control. Cabe decir que se ha descrito que la línea 184B5 expresa la proteína p53 *wild-type* y por lo tanto la proteína detectada sería funcional. La reducción observada de los niveles de p53 podría explicar, al menos en parte, el incremento en la proliferación inducido por *CUL4A* ya que este supresor tumoral regula de forma negativa el ciclo celular. Asimismo, p53 se ha implicado en la regulación del punto de control de tetraploidía (*tetraploid checkpoint*) o postmitótico existente en G1 que evita la progresión de células tetraploides a través del ciclo celular (Andreassen *et al.*, 2001; Borel *et al.*, 2002). Por lo tanto la disminución observada en los niveles de p53 y el consiguiente fallo de este punto de control podría contribuir a explicar el incremento del número de células poliploides en fase S detectado al sobreexpresar *CUL4A* en las células 184B5.

En contraposición a lo observado con el modelo de sobreexpresión de *CUL4A*, el silenciamiento de *CUL4A* en la línea tumoral HCC1937 sí indujo la modulación de los niveles de p21 y p27 observándose un aumento de ambas proteínas asociado a la menor expresión de *CUL4A*. La acumulación de estas proteínas provocaría una parada más larga del punto de control del ciclo celular existente en G1/S y, por lo tanto, un retraso en la entrada de las células en la fase de síntesis. Este efecto podría explicar la reducción observada en la proliferación de los modelos celulares tumorales con el silenciamiento de *CUL4A* tanto en los experimentos *in vitro* como *in vivo*. Estos resultados estarían en armonía con los observados en células tumorales de mesotelioma pleural maligno donde se produce la acumulación de ambas proteínas

con el silenciamiento de *CUL4A* y una reducción del crecimiento celular (Hung *et al.*, 2011). Además, en modelos de ratón *knockout* para *Cul4a* se ha descrito la acumulación de p21 (Liu *et al.*, 2009) y p27 (Kopanja *et al.*, 2009) en fibroblastos embrionarios de ratón *Cul4a*<sup>-/-</sup> que provocaría una parada prolongada en G1/S impidiendo la entrada de las células en fase S.

En conjunto, al igual que se ha descrito en otros tipos tumorales, los resultados de este trabajo apuntarían a p21, p27 y/o p53 como mediadores del efecto oncogénico de *CUL4A* en cáncer de mama.

#### **4. LA METALOTIONEÍNA MT2A PODRÍA SER UNA NUEVA MOLÉCULA MEDIADORA DEL PAPEL ONCOGÉNICO DE CUL4A EN CÁNCER DE MAMA**

Debido a la enorme versatilidad que presentan los complejos CUL4A E3 ubiquitina ligasas en lo que se refiere a las posibilidades de interacción con proteínas adaptadoras y sustratos, no solo para marcar para degradación sino también para señalización, cabría esperar que el espectro de proteínas reguladas por *CUL4A* fuese bastante amplio. Es por ello que, además del análisis dirigido hacia dianas conocidos de *CUL4A* se quisieron identificar nuevas proteínas y rutas moleculares asociadas, de forma directa o indirecta, al papel oncogénico del gen que pudiesen explicar, al menos en parte, los fenotipos observados en los experimentos *in vitro* e *in vivo*. Para ello se planteó un análisis global no limitado por datos o hipótesis previas que permitirse identificar y cuantificar proteínas cuyos niveles variasen con la modulación de la expresión de *CUL4A*.

Para ello se llevó a cabo el análisis de las proteínas expresadas diferencialmente entre las células con sobreexpresión y silenciamiento de *CUL4A* y sus respectivos controles mediante la tecnología iTRAQ seleccionándose aquellas que mostraron tendencias de expresión en sentido opuesto según se tratase del modelo de sobreexpresión o los de silenciamiento. La identificación de efectos similares inducidos por el silenciamiento de *CUL4A* en dos réplicas biológicas (líneas HCC1937 y MDAMB157) y la búsqueda de los efectos contrarios en el modelo de sobreexpresión (línea 184B5), llevó a la definición de una lista final restringida a 41 proteínas candidatas. Cabe destacar que *CUL4A* fue la proteína más diferencialmente expresada y en los sentidos esperados para cada modelo, lo que además de corroborar los resultados obtenidos por

WB en los modelos celulares, constituyo una validación técnica del procedimiento de iTRAQ y apoyó *a priori* la validez del resto de proteínas incluidas en la lista de candidatas.

Dado el planteamiento del experimento, los puntos de corte establecidos y las sublistas generadas dentro de la lista inicial, se consideró que la proteína Metalotioneina-2 (MT2A) cumplió con las condiciones más exigentes establecidas (proteína detectada en los tres modelos celulares y con tendencias de expresión opuestas: reprimida en los dos modelos de silenciamiento y sobreexpresada en el modelo de sobreexpresión de *CUL4A*). La expresión diferencial de MT2A se validó mediante WB en el modelo de sobreexpresión (mayores niveles que sobreexpresaban *CUL4A*) y, a través de IHQ, en los xenografts generados por las líneas tumorales (menores niveles con el silenciamiento). El patrón de inmunotinción de MT2A reveló una distribución de la proteína en focos diseminados que en su conjunto no constituirían grandes cantidades de proteína lo que explicaría la baja contabilización de péptidos mediante iTRAQ y la dificultad para detectar la proteína por WB.

Las metalotioneinas (MTs) son una clase de proteínas de bajo peso molecular (alrededor de 61 aminoácidos) ubicuas e inducibles que contienen un alto contenido en cisteínas y presentan afinidad por la unión específica de iones metálicos pudiendo unir tanto metales esenciales (zinc y cobre) como metales tóxicos (cadmio y mercurio) (Bremner and Beattie, 1990; Hamer, 1986; Kagi and Valee, 1960). En humanos, los genes MT se localizan en el cromosoma 13q13 en un clúster que puede involucrar hasta 10 genes funcionales (Cherian *et al.*, 2003). Aunque las proteínas MT2, MT3 y MT4 están codificadas por un único gen, la proteína MT1 comprende varios subtipos codificados por un grupo de genes MT1. Las isoformas conocidas y funcionales de los genes MT1 y MT2 son MT1A, -1B, -1E, -1F, -1G, -1H, -1X y MT2A (Cherian *et al.*, 2003). Las proteínas MT participan en diversas funciones homeostáticas y bioquímicas en el cuerpo. Se las relaciona con la regulación de la proliferación y la diferenciación, especialmente durante el desarrollo fetal (Apostolova *et al.*, 2000; Nartey *et al.*, 1987). Protegen del estrés oxidativo y actúan como "scavenger" de especies reactivas de oxígeno, protegiendo a células y macromoléculas como el DNA, proteínas y lípidos contra el daño oxidativo ocasionado por superóxidos, peróxidos y de radicales hidroxilo generados por las millones de reacciones metabólicas que ocurren en la célula (Cai *et al.*, 2000; Sato and Bremner, 1993; Shibuya *et al.*, 2008). Además se conoce que las proteínas MT participan en la regulación de la apoptosis mediante la inhibición de la muerte celular y aumentando la supervivencia celular en períodos de estrés (Cai *et al.*, 2000; Shimoda *et al.*, 2003).



Se ha sugerido su participación en la carcinogénesis ya que los elevados niveles de MT protegerían a las células de la apoptosis y promoverían la proliferación celular, por lo tanto potenciando la tumorigénesis (Cherian *et al.*, 1994). De hecho, varios estudios muestran que el incremento de la expresión de las proteínas MT está estrechamente asociado al grado tumoral y a la actividad proliferativa en tumores sólidos (Cherian *et al.*, 2003; Kondo *et al.*, 1997).

Los resultados obtenidos en el presente trabajo sugieren que CUL4A regularía los niveles de MT2A y que esta proteína podría ser mediadora del papel oncogénico de CUL4A en cáncer de mama. La sobreexpresión de CUL4A se asoció con altos niveles de MT2A y estos podrían contribuir a la adquisición de características transformadas de la línea 184B5 con sobreexpresión de *CUL4A*. Por otra parte, la represión de MT2A al reducir los niveles de expresión de CUL4A, podría favorecer el fenotipo menos agresivo observado en las líneas HCC1937 y MDAMB157. Esta hipótesis se vería respaldada por hallazgos previos que identifican la isoforma MT2A como la metalotioneína más abundantemente expresada en cáncer de mama y que correlacionan positivamente sus niveles de mRNA con la elevada proliferación celular y el alto grado histológico de estos tumores (Cherian *et al.*, 2003; Tai *et al.*, 2003). Además, se ha demostrado que la reducción de los niveles de MT2A inhiben el crecimiento de la línea celular de cáncer de mama humano MCF7, lo que apoya la participación activa de esta isoforma en la actividad proliferativa de las células de cáncer de mama (Jin *et al.*, 2002).

Puesto que los niveles de MT2A aumentan al aumentar la expresión de CUL4A, MT2A no sería una diana directa de CUL4A en cuanto a su poliubiquitinación y marcaje para degradación. Se podría pensar en una regulación indirecta de manera que CUL4A podría participar en la degradación de alguna molécula represora de MT2A o de un supresor tumoral que inhibiese su acción. Por otro lado, es conocido que CUL4A puede monoubiquitinar proteínas para estabilizarlas en lugar de marcarlas para degradación (Kapetanaki *et al.*, 2006; Sugawara, 2006). Estudios funcionales que aporten información sobre el carácter de la interacción entre ambas proteínas deberían llevarse a cabo. De igual modo, experimentos para revertir el fenotipo tumoral a través de la inhibición de esta proteína y estudios de inmunohistoquímica en tumores primarios para estudiar la asociación de su expresión con la de CUL4A deberían llevarse a cabo en orden de asentar su participación en cáncer de mama.

De entre las funciones que aparecerían más representadas en la lista restringida de proteínas candidatas a estar moduladas por CUL4A se encuentran procesos similares a la ubiquitinación, remodelación de la cromatina, adhesión celular y la ruta molecular Rho.

La familia de histonas H4 la histona a la cual pertenece HIST1H4A es ubiquitinada por el complejo ubiquitina ligasa CUL4-DDB-RBX1 en relación a la reorganización de la de la cromatina para favorecer la entrada de proteínas involucradas en la reparación del DNA (Wang *et al.*, 2006). La sobreexpresión de esta histona en los resultados de iTRAQ acompañada de los elevados niveles de CUL4A y el fenotipo transformado podría estar reflejando los requerimientos celulares de la proteína en el proceso mencionado.

Por otro lado, la sobreexpresión de TMPO y de TJP1 se ha descrito en diferentes tumores primarios (Kim *et al.*, 2012; Kleeff *et al.*, 2001; Parise *et al.*, 2006; Resnick *et al.*, 2005; Smalley *et al.*, 2005; Ward *et al.*, 2011). En los resultados de iTRAQ se observó sobreexpresión de estas proteínas con los altos niveles de CUL4A por lo que estaría en conformidad con lo descrito previamente.

Finalmente, se detecta la sobreexpresión de KI67 con los altos niveles de CUL4A y la represión de la misma con los bajos niveles de expresión del gen lo que parecería explicar el incremento en proliferación inducido por la sobreexpresión de CUL4A. La caracterización de la proliferación mediante la inmunotinción de MKI67 está ampliamente establecido en cáncer de mama (Urruticoechea *et al.*, 2005) encontrándose que su expresión es una característica fundamental en la progresión de los tumores.

Hay que mencionar la ausencia de muchas dianas moleculares conocidas y establecidas de la actividad de CUL4A (por ejemplo p21 o p27) entre las proteínas identificadas por iTRAQ y que forman parte de la lista final de candidatas. Además del límite de detección inherente a la técnica hay que tener en cuenta otros factores biológicos que restringen dicha identificación como son las variantes de escisión (splice variants), las modificaciones post-traslacionales de las proteínas, los rangos dinámicos en el número de copias que pueden alcanzar hasta diez rangos de magnitud, la estabilidad de las proteínas, asociaciones de proteínas transitorias y dependencia del tipo de célula o del estado fisiológico (Mallick and Kuster). Por otra parte hay que tener en cuenta que en la lista final sólo se incluyeron proteínas identificadas en los tres modelos. Es posible que la estrategia basada en la búsqueda de proteínas representadas en los tres modelos

sea muy estricta y se estén quedando fuera del análisis proteínas reguladas por CUL4A que sean de especial interés para el proceso tumoral. Quizás el de cada línea por separado pueda aportar información valiosa. En se sentido cabe destacar que por ejemplo se detectó la sobreexpresión de la proteína diana conocida de CUL4A DDB2 en el modelo de silenciamiento HCC1937 (Chen *et al.*, 2001; Groisman *et al.*, 2003; Nichols *et al.*, 2000; Sugawara *et al.*, 2005) o de la histona HIST1H4A es ubiquitinada por el complejo ubiquitina ligasa CUL4-DDB-RBX1 (Wang *et al.*, 2006).



# Conclusiones



1. La caracterización de la región 13q34 en cáncer de mama ha permitido la identificación de *CUL4A* y *TFDP1* como posibles genes candidatos a ser diana de esta amplificación. El número de copias de DNA de estos genes determina de forma significativa sus niveles de expresión génica y proteica independientemente de la existencia de otros mecanismos reguladores que expliquen su sobreexpresión en ausencia de amplificación.
2. La sobreexpresión exógena de *CUL4A* en la línea celular inmortalizada pero no transformada 184B5 indujo una mayor proliferación celular asociada con un incremento en la síntesis de ADN. Asimismo se asoció con un aumento de células poliploides capaces de entrar en fase de síntesis y con una mayor habilidad para formar colonias en condiciones tanto dependientes como independientes de anclaje. Sin embargo, el xenotransplante de las células modificadas en ratones inmunodeprimidos no indujo la formación de tumores..
3. El silenciamiento de *CUL4A* en las líneas tumorales de mama de fenotipo basal MDAMB157 y HCC193, que amplifican y/o sobreexpresan *CUL4A*, se asoció con una reducción de la proliferación celular y una disminución del porcentaje de células en la fase de síntesis de ADN. Asimismo produjo una reducción en la capacidad para formar colonias tanto en condiciones dependientes como independientes de anclaje y disminuyó la tasa de crecimiento de tumores generados mediante xenotransplante en ratones inmunodeprimidos.
4. En contraposición a lo observado en las células tumorales HCC1937 y MDA-MB-157, el silenciamiento de *CUL4A* en las células 184B5 inmortalizadas pero no tumorales no redujo su viabilidad. En consonancia con el concepto de adicción oncogénica estos resultados apoyarían la dependencia que las células que sobreexpresan *CUL4A* desarrollarían a la continuada expresión del gen para el mantenimiento de su estado neoplásico.
5. Mediante el análisis global de las proteínas expresadas diferencialmente al sobreexpresar y silenciar *CUL4A* en nuestros modelos celulares hemos identificado a la Metalotioneina-2 (MT2A) como una nueva candidata a mediar del efecto oncogénico de *CUL4A* en cáncer de

mama. Además proponemos la participación de *CUL4A* en el proceso tumoral a través de la regulación, directa o indirecta de proteínas involucradas, entre otros, en procesos como la remodelación de la cromatina, proliferación, adhesión celular o con la ruta molecular Rho.

6. En conjunto nuestros resultados evidencian el papel oncogénico de *CUL4A* y apoyan su posible implicación en la progresión y agresividad tumoral más que su participación en los eventos iniciales desencadenantes de la carcinogénesis.



# Bibliografía



Abba MC, Fabris VT, Hu Y, Kittrell FS, Cai WW, Donehower LA *et al* (2007). Identification of novel amplification gene targets in mouse and human breast cancer at a syntenic cluster mapping to mouse ch8A1 and human ch13q34. *Cancer Res* **67**: 4104-12.

Albertson DG (2006). Gene amplification in cancer. *Trends Genet* **22**: 447-55.

Ali S, Coombes RC (2002). Endocrine-responsive breast cancer and strategies for combating resistance. *Nat Rev Cancer* **2**: 101-12.

Allen NE, Beral V, Casabonne D, Kan SW, Reeves GK, Brown A *et al* (2009). Moderate alcohol intake and cancer incidence in women. *J Natl Cancer Inst* **101**: 296-305.

Andreassen PR, Lohez OD, Lacroix FB, Margolis RL (2001). Tetraploid state induces p53-dependent arrest of nontransformed mammalian cells in G1. *Mol Biol Cell* **12**: 1315-28.

Angers S, Li T, Yi X, MacCoss MJ, Moon RT, Zheng N (2006). Molecular architecture and assembly of the DDB1-CUL4A ubiquitin ligase machinery. *Nature* **443**: 590-3.

Apostolova MD, Ivanova IA, Cherian MG (2000). Signal transduction pathways, and nuclear translocation of zinc and metallothionein during differentiation of myoblasts. *Biochem Cell Biol* **78**: 27-37.

Ashworth A (2008). A synthetic lethal therapeutic approach: poly(ADP) ribose polymerase inhibitors for the treatment of cancers deficient in DNA double-strand break repair. *J Clin Oncol* **26**: 3785-90.

Balasenthil S, Sahin AA, Barnes CJ, Wang RA, Pestell RG, Vadlamudi RK *et al* (2004). p21-activated kinase-1 signaling mediates cyclin D1 expression in mammary epithelial and cancer cells. *J Biol Chem* **279**: 1422-8.

Bentires-Alj M, Gil SG, Chan R, Wang ZC, Wang Y, Imanaka N *et al* (2006). A role for the scaffolding adapter GAB2 in breast cancer. *Nat Med* **12**: 114-21.

Beral V (2003). Breast cancer and hormone-replacement therapy in the Million Women Study. *Lancet* **362**: 419-27.

Bergamaschi A, Kim YH, Wang P, Sorlie T, Hernandez-Boussard T, Lonning PE *et al* (2006). Distinct patterns of DNA copy number alteration are associated with different clinicopathological features and gene-expression subtypes of breast cancer. *Genes Chromosomes Cancer* **45**: 1033-40.

Bernard-Pierrot I, Gruel N, Stransky N, Vincent-Salomon A, Reyat F, Raynal V *et al* (2008). Characterization of the recurrent 8p11-12 amplicon identifies PPAPDC1B, a phosphatase protein, as a new therapeutic target in breast cancer. *Cancer Res* **68**: 7165-75.

Bocanegra M, Bergamaschi A, Kim YH, Miller MA, Rajput AB, Kao J *et al* (2010). Focal amplification and oncogene dependency of GAB2 in breast cancer. *Oncogene* **29**: 774-9.

Borel F, Lohez OD, Lacroix FB, Margolis RL (2002). Multiple centrosomes arise from tetraploidy checkpoint failure and mitotic centrosome clusters in p53 and RB pocket protein-compromised cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**: 9819-24.

Bremner I, Beattie JH (1990). Metallothionein and the trace minerals. *Annu Rev Nutr* **10**: 63-83.

Brough R, Frankum JR, Sims D, Mackay A, Mendes-Pereira AM, Bajrami I *et al* (2011). Functional viability profiles of breast cancer. *Cancer Discov* **1**: 260-73.

Cabanes A, Vidal E, Aragonés N, Pérez-Gómez B, Pollán M, Lope V *et al* (2010). Cancer mortality trends in Spain: 1980-2007. *Ann Oncol* **21 Suppl 3**: iii14-20.

Cai L, Klein JB, Kang YJ (2000). Metallothionein inhibits peroxynitrite-induced DNA and lipoprotein damage. *J Biol Chem* **275**: 38957-60.

Campbell PJ, Stephens PJ, Pleasance ED, O'Meara S, Li H, Santarius T *et al* (2008). Identification of somatically acquired rearrangements in cancer using genome-wide massively parallel paired-end sequencing. *Nat Genet* **40**: 722-9.

Cancer CGoHFIB (2002). Breast cancer and breastfeeding: collaborative reanalysis of individual data from 47 epidemiological studies in 30 countries, including 50302 women with breast cancer and 96973 women without the disease. *Lancet* **360**: 187-95.

Carneiro A, Isinger A, Karlsson A, Johansson J, Jonsson G, Bendahl PO *et al* (2008). Prognostic impact of array-based genomic profiles in esophageal squamous cell cancer. *BMC Cancer* **8**: 98.

Castillo SD, Angulo B, Suarez-Gauthier A, Melchor L, Medina PP, Sanchez-Verde L *et al* (2010). Gene amplification of the transcription factor DP1 and CTNND1 in human lung cancer. *J Pathol* **222**: 89-98.

Clark GJ, Der CJ (1995). Aberrant function of the Ras signal transduction pathway in human breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* **35**: 133-44.

Chandriani S, Frengen E, Cowling VH, Pendergrass SA, Perou CM, Whitfield ML *et al* (2009). A core MYC gene expression signature is prominent in basal-like breast cancer but only partially overlaps the core serum response. *PLoS One* **4**: e6693.

Chen LC, Manjeshwar S, Lu Y, Moore D, Ljung BM, Kuo WL *et al* (1998). The human homologue for the *Caenorhabditis elegans* cul-4 gene is amplified and overexpressed in primary breast cancers. *Cancer Res* **58**: 3677-83.

Chen X, Zhang Y, Douglas L, Zhou P (2001). UV-damaged DNA-binding proteins are targets of CUL-4A-mediated ubiquitination and degradation. *J Biol Chem* **276**: 48175-82.

Cherian MG, Howell SB, Imura N, Klaassen CD, Koropatnick J, Lazo JS *et al* (1994). Role of metallothionein in carcinogenesis. *Toxicol Appl Pharmacol* **126**: 1-5.

Cherian MG, Jayasurya A, Bay BH (2003). Metallothioneins in human tumors and potential roles in carcinogenesis. *Mutat Res* **533**: 201-9.

Chin K, DeVries S, Fridlyand J, Spellman PT, Roydasgupta R, Kuo WL *et al* (2006). Genomic and transcriptional aberrations linked to breast cancer pathophysiologies. *Cancer Cell* **10**: 529-41.

Chunder N, Mandal S, Roy A, Roychoudhury S, Panda CK (2004). Analysis of different deleted regions in chromosome 11 and their interrelations in early- and late-onset breast tumors: association with cyclin D1 amplification and survival. *Diagn Mol Pathol* **13**: 172-82.

Dedes KJ, Lopez-Garcia MA, Geyer FC, Lambros MB, Savage K, Vatcheva R *et al* (2010). Cortactin gene amplification and expression in breast cancer: a chromogenic in situ hybridisation and immunohistochemical study. *Breast Cancer Res Treat* **124**: 653-66.

Dohna M, Reincke M, Mincheva A, Allolio B, Solinas-Toldo S, Lichter P (2000). Adrenocortical carcinoma is characterized by a high frequency of chromosomal gains and high-level amplifications. *Genes Chromosomes Cancer* **28**: 145-52.

Elenbaas B, Spirio L, Koerner F, Fleming MD, Zimonjic DB, Donaher JL *et al* (2001). Human breast cancer cells generated by oncogenic transformation of primary mammary epithelial cells. *Genes Dev* **15**: 50-65.

Elsheikh S, Green AR, Aleskandarany MA, Grainge M, Paish CE, Lambros MB *et al* (2008). CCND1 amplification and cyclin D1 expression in breast cancer and their relation with proteomic subgroups and patient outcome. *Breast Cancer Res Treat* **109**: 325-35.

Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM (2010). Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *Int J Cancer* **127**: 2893-917.

Foulkes WD, Brunet JS, Stefansson IM, Straume O, Chappuis PO, Begin LR *et al* (2004). The prognostic implication of the basal-like (cyclin E high/p27 low/p53+/glomeruloid-microvascular-proliferation+) phenotype of BRCA1-related breast cancer. *Cancer Res* **64**: 830-5.

Foulkes WD, Stefansson IM, Chappuis PO, Begin LR, Goffin JR, Wong N *et al* (2003). Germline BRCA1 mutations and a basal epithelial phenotype in breast cancer. *J Natl Cancer Inst* **95**: 1482-5.

Fulda S, Rajalingam K, Dikic I (2012). Ubiquitylation in immune disorders and cancer: from molecular mechanisms to therapeutic implications. *EMBO Mol Med* **4**: 545-56.

Gansauge S, Gansauge F, Ramadani M, Stobbe H, Rau B, Harada N *et al* (1997). Overexpression of cyclin D1 in human pancreatic carcinoma is associated with poor prognosis. *Cancer Res* **57**: 1634-7.

Garber JE, Goldstein AM, Kantor AF, Dreyfus MG, Fraumeni JF, Jr., Li FP (1991). Follow-up study of twenty-four families with Li-Fraumeni syndrome. *Cancer Res* **51**: 6094-7.

Garcia MJ, Pole JC, Chin SF, Teschendorff A, Naderi A, Ozdag H *et al* (2005). A 1 Mb minimal amplicon at 8p11-12 in breast cancer identifies new candidate oncogenes. *Oncogene* **24**: 5235-45.

Gelsi-Boyer V, Orsetti B, Cervera N, Finetti P, Sircoulomb F, Rouge C *et al* (2005). Comprehensive profiling of 8p11-12 amplification in breast cancer. *Mol Cancer Res* **3**: 655-67.

Girling R, Partridge JF, Bandara LR, Burden N, Totty NF, Hsuan JJ *et al* (1993). A new component of the transcription factor DRTF1/E2F. *Nature* **365**: 468.

Gollin SM (2001). Chromosomal alterations in squamous cell carcinomas of the head and neck: window to the biology of disease. *Head Neck* **23**: 238-53.

Grillo M, Bott MJ, Khandke N, McGinnis JP, Miranda M, Meyyappan M *et al* (2006). Validation of cyclin D1/CDK4 as an anticancer drug target in MCF-7 breast cancer cells: Effect of regulated overexpression of cyclin D1 and siRNA-mediated inhibition of endogenous cyclin D1 and CDK4 expression. *Breast Cancer Res Treat* **95**: 185-94.

Groisman R, Polanowska J, Kuraoka I, Sawada J, Saijo M, Drapkin R *et al* (2003). The ubiquitin ligase activity in the DDB2 and CSA complexes is differentially regulated by the COP9 signalosome in response to DNA damage. *Cell* **113**: 357-67.

Gstaiger M, Jordan R, Lim M, Catzavelos C, Mestan J, Slingerland J *et al* (2001). Skp2 is oncogenic and overexpressed in human cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: 5043-8.

Gupta A, Yang LX, Chen L (2002). Study of the G2/M cell cycle checkpoint in irradiated mammary epithelial cells overexpressing Cul-4A gene. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **52**: 822-30.

Hamer DH (1986). Metallothionein. *Annu Rev Biochem* **55**: 913-51.

Hanahan D, Weinberg RA (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* **144**: 646-74.

He YJ, McCall CM, Hu J, Zeng Y, Xiong Y (2006). DDB1 functions as a linker to recruit receptor WD40 proteins to CUL4-ROC1 ubiquitin ligases. *Genes Dev* **20**: 2949-54.

Helin K, Wu CL, Fattaey AR, Lees JA, Dynlacht BD, Ngwu C *et al* (1993). Heterodimerization of the transcription factors E2F-1 and DP-1 leads to cooperative trans-activation. *Genes Dev* **7**: 1850-61.

Hemminki A, Markie D, Tomlinson I, Avizienyte E, Roth S, Loukola A *et al* (1998). A serine/threonine kinase gene defective in Peutz-Jeghers syndrome. *Nature* **391**: 184-7.

Higa LA, Wu M, Ye T, Kobayashi R, Sun H, Zhang H (2006a). CUL4-DDB1 ubiquitin ligase interacts with multiple WD40-repeat proteins and regulates histone methylation. *Nat Cell Biol* **8**: 1277-83.

Higa LA, Yang X, Zheng J, Banks D, Wu M, Ghosh P *et al* (2006b). Involvement of CUL4 ubiquitin E3 ligases in regulating CDK inhibitors Dacapo/p27Kip1 and cyclin E degradation. *Cell Cycle* **5**: 71-7.

Holland DG, Burleigh A, Git A, Goldgraben MA, Perez-Mancera PA, Chin SF *et al* (2011). ZNF703 is a common Luminal B breast cancer oncogene that differentially regulates luminal and basal progenitors in human mammary epithelium. *EMBO Mol Med* **3**: 167-80.

Hui R, Campbell DH, Lee CS, McCaul K, Horsfall DJ, Musgrove EA *et al* (1997). EMS1 amplification can occur independently of CCND1 or INT-2 amplification at 11q13 and may identify different phenotypes in primary breast cancer. *Oncogene* **15**: 1617-23.

Hung MS, Mao JH, Xu Z, Yang CT, Yu JS, Harvard C *et al* (2011). Cul4A is an oncogene in malignant pleural mesothelioma. *J Cell Mol Med* **15**: 350-8.

Jin J, Arias EE, Chen J, Harper JW, Walter JC (2006). A family of diverse Cul4-Ddb1-interacting proteins includes Cdt2, which is required for S phase destruction of the replication factor Cdt1. *Mol Cell* **23**: 709-21.

Jin R, Chow VT, Tan PH, Dheen ST, Duan W, Bay BH (2002). Metallothionein 2A expression is associated with cell proliferation in breast cancer. *Carcinogenesis* **23**: 81-6.

Jirstrom K, Stendahl M, Ryden L, Kronblad A, Bendahl PO, Stal O *et al* (2005). Adverse effect of adjuvant tamoxifen in premenopausal breast cancer with cyclin D1 gene amplification. *Cancer Res* **65**: 8009-16.

Kagi JH, Valee BL (1960). Metallothionein: a cadmium- and zinc-containing protein from equine renal cortex. *J Biol Chem* **235**: 3460-5.

Kao J, Pollack JR (2006). RNA interference-based functional dissection of the 17q12 amplicon in breast cancer reveals contribution of coamplified genes. *Genes Chromosomes Cancer* **45**: 761-9.

Kapetanaki MG, Guerrero-Santoro J, Bisi DC, Hsieh CL, Rapic-Otrin V, Levine AS (2006). The DDB1-CUL4A/CUL4B ubiquitin ligase is deficient in xeroderma pigmentosum group E and targets histone H2A at UV-damaged DNA sites. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**: 2588-93.

Kim HJ, Hwang SH, Han ME, Baek S, Sim HE, Yoon S *et al* (2012). LAP2 is widely overexpressed in diverse digestive tract cancers and regulates motility of cancer cells. *PLoS One* **7**: e39482.

Kim Y, Starostina NG, Kipreos ET (2008). The CRL4Cdt2 ubiquitin ligase targets the degradation of p21Cip1 to control replication licensing. *Genes Dev* **22**: 2507-19.

Kleeff J, Shi X, Bode HP, Hoover K, Shrikhande S, Bryant PJ *et al* (2001). Altered expression and localization of the tight junction protein ZO-1 in primary and metastatic pancreatic cancer. *Pancreas* **23**: 259-65.

Kondo Y, Rusnak JM, Hoyt DG, Settineri CE, Pitt BR, Lazo JS (1997). Enhanced apoptosis in metallothionein null cells. *Mol Pharmacol* **52**: 195-201.

Kopanja D, Stoyanova T, Okur MN, Huang E, Bagchi S, Raychaudhuri P (2009). Proliferation defects and genome instability in cells lacking Cul4A. *Oncogene* **28**: 2456-65.

Kwek SS, Roy R, Zhou H, Climent J, Martinez-Climent JA, Fridlyand J *et al* (2009). Co-amplified genes at 8p12 and 11q13 in breast tumors cooperate with two major pathways in oncogenesis. *Oncogene* **28**: 1892-903.

Lee J, Zhou P (2010). Cullins and cancer. *Genes Cancer* **1**: 690-9.

Lee J, Zhou P (2012). Pathogenic Role of the CRL4 Ubiquitin Ligase in Human Disease. *Front Oncol* **2**: 21.

Lee W, Jiang Z, Liu J, Haverty PM, Guan Y, Stinson J *et al* (2010). The mutation spectrum revealed by paired genome sequences from a lung cancer patient. *Nature* **465**: 473-7.

Li T, Hung MS, Wang Y, Mao JH, Tan JL, Jahan K *et al* (2011). Transgenic mice for cre-inducible overexpression of the Cul4A gene. *Genesis* **49**: 134-41.

Liu L, Lee S, Zhang J, Peters SB, Hannah J, Zhang Y *et al* (2009). CUL4A abrogation augments DNA damage response and protection against skin carcinogenesis. *Mol Cell* **34**: 451-60.

Lundgren K, Holm K, Nordenskjold B, Borg A, Landberg G (2008). Gene products of chromosome 11q and their association with CCND1 gene amplification and tamoxifen resistance in premenopausal breast cancer. *Breast Cancer Res* **10**: R81.

Malkin D (1994). Germline p53 mutations and heritable cancer. *Annu Rev Genet* **28**: 443-65.

Mallick P, Kuster B Proteomics: a pragmatic perspective. *Nat Biotechnol* **28**: 695-709.

Meijers-Heijboer H, van den Ouweland A, Klijn J, Wasielewski M, de Snoo A, Oldenburg R *et al* (2002). Low-penetrance susceptibility to breast cancer due to CHEK2(\*)1100delC in noncarriers of BRCA1 or BRCA2 mutations. *Nat Genet* **31**: 55-9.

Melchor L, Alvarez S, Honrado E, Palacios J, Barroso A, Diez O *et al* (2005). The accumulation of specific amplifications characterizes two different genomic pathways of evolution of familial breast tumors. *Clin Cancer Res* **11**: 8577-84.

Melchor L, Garcia MJ, Honrado E, Pole JC, Alvarez S, Edwards PA *et al* (2007a). Genomic analysis of the 8p11-12 amplicon in familial breast cancer. *Int J Cancer* **120**: 714-7.

Melchor L, Honrado E, Garcia MJ, Alvarez S, Palacios J, Osorio A *et al* (2007b). Distinct genomic aberration patterns are found in familial breast cancer associated with different immunohistochemical subtypes. *Oncogene*.

Melchor L, Honrado E, Garcia MJ, Alvarez S, Palacios J, Osorio A *et al* (2008). Distinct genomic aberration patterns are found in familial breast cancer associated with different immunohistochemical subtypes. *Oncogene* **27**: 3165-75.

Melchor L, Honrado E, Huang J, Alvarez S, Naylor TL, Garcia MJ *et al* (2007c). Estrogen receptor status could modulate the genomic pattern in familial and sporadic breast cancer. *Clin Cancer Res* **13**: 7305-13.

Melchor L, Saucedo-Cuevas LP, Munoz-Repeto I, Rodriguez-Pinilla SM, Honrado E, Campoverde A *et al* (2009). Comprehensive characterization of the DNA amplification at 13q34 in human breast cancer reveals TFDP1 and CUL4A as likely candidate target genes. *Breast Cancer Res* **11**: R86.



- Michailidou K, Hall P, Gonzalez-Neira A, Ghoussaini M, Dennis J, Milne RL *et al* (2013). Large-scale genotyping identifies 41 new loci associated with breast cancer risk. *Nat Genet* **45**: 353-61.
- Michiels EM, Weiss MM, Hoovers JM, Baak JP, Voute PA, Baas F *et al* (2002). Genetic alterations in childhood medulloblastoma analyzed by comparative genomic hybridization. *J Pediatr Hematol Oncol* **24**: 205-10.
- Miki Y, Swensen J, Shattuck-Eidens D, Futreal PA, Harshman K, Tavtigian S *et al* (1994). A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1. *Science* **266**: 66-71.
- Monninkhof EM, Elias SG, Vlems FA, van der Tweel I, Schuit AJ, Voskuil DW *et al* (2007). Physical activity and breast cancer: a systematic review. *Epidemiology* **18**: 137-57.
- Moon A, Kim MS, Kim TG, Kim SH, Kim HE, Chen YQ *et al* (2000). H-ras, but not N-ras, induces an invasive phenotype in human breast epithelial cells: a role for MMP-2 in the H-ras-induced invasive phenotype. *Int J Cancer* **85**: 176-81.
- Mottolese M, Orlandi G, Sperduti I, Merola R, Buglioni S, Di Benedetto A *et al* (2007). Bio-pathologic characteristics related to chromosome 11 aneusomy and cyclin D1 gene status in surgically resected stage I and II breast cancer: Identification of an adverse prognostic profile. *Am J Surg Pathol* **31**: 247-54.
- Nag A, Bagchi S, Raychaudhuri P (2004). Cul4A physically associates with MDM2 and participates in the proteolysis of p53. *Cancer Res* **64**: 8152-5.
- Nartey NO, Banerjee D, Cherian MG (1987). Immunohistochemical localization of metallothionein in cell nucleus and cytoplasm of fetal human liver and kidney and its changes during development. *Pathology* **19**: 233-8.
- Natrajan R, Lambros MB, Rodriguez-Pinilla SM, Moreno-Bueno G, Tan DS, Marchio C *et al* (2009). Tiling path genomic profiling of grade 3 invasive ductal breast cancers. *Clin Cancer Res* **15**: 2711-22.
- Natrajan R, Mackay A, Wilkerson PM, Lambros MB, Wetterskog D, Arnedos M *et al.* (2012). *Breast Cancer Res, Vol. 14*, pp R53.
- Natrajan R, Weigelt B, Mackay A, Geyer FC, Grigoriadis A, Tan DS *et al* (2010). An integrative genomic and transcriptomic analysis reveals molecular pathways and networks regulated by copy number aberrations in basal-like, HER2 and luminal cancers. *Breast Cancer Res Treat* **121**: 575-89.
- Nelen MR, Padberg GW, Peeters EA, Lin AY, van den Helm B, Frants RR *et al* (1996). Localization of the gene for Cowden disease to chromosome 10q22-23. *Nat Genet* **13**: 114-6.
- Network TcGA (2012). Comprehensive molecular portraits of human breast tumours. *Nature* **490**: 61-70.

- Nichols AF, Itoh T, Graham JA, Liu W, Yamaizumi M, Linn S (2000). Human damage-specific DNA-binding protein p48. Characterization of XPE mutations and regulation following UV irradiation. *J Biol Chem* **275**: 21422-8.
- Nishitani H, Shiomi Y, Iida H, Michishita M, Takami T, Tsurimoto T (2008). CDK inhibitor p21 is degraded by a proliferating cell nuclear antigen-coupled Cul4-DDB1Cdt2 pathway during S phase and after UV irradiation. *J Biol Chem* **283**: 29045-52.
- Nymark P, Guled M, Borze I, Faisal A, Lahti L, Salmenkivi K *et al* (2011). Integrative analysis of microRNA, mRNA and aCGH data reveals asbestos- and histology-related changes in lung cancer. *Genes Chromosomes Cancer* **50**: 585-97.
- Palacios J, Honrado E, Osorio A, Cazorla A, Sarrio D, Barroso A *et al* (2005). Phenotypic characterization of BRCA1 and BRCA2 tumors based in a tissue microarray study with 37 immunohistochemical markers. *Breast Cancer Res Treat* **90**: 5-14.
- Parise P, Finocchiaro G, Masciadri B, Quarto M, Francois S, Mancuso F *et al* (2006). Lap2alpha expression is controlled by E2F and deregulated in various human tumors. *Cell Cycle* **5**: 1331-41.
- Perou CM (2011). Molecular stratification of triple-negative breast cancers. *Oncologist* **16 Suppl 1**: 61-70.
- Perou CM, Sorlie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA *et al* (2000). Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* **406**: 747-52.
- Pleasance ED, Cheetham RK, Stephens PJ, McBride DJ, Humphray SJ, Greenman CD *et al* (2010). A comprehensive catalogue of somatic mutations from a human cancer genome. *Nature* **463**: 191-6.
- Rahman N, Seal S, Thompson D, Kelly P, Renwick A, Elliott A *et al* (2007). PALB2, which encodes a BRCA2-interacting protein, is a breast cancer susceptibility gene. *Nat Genet* **39**: 165-7.
- Reeves GK, Pirie K, Beral V, Green J, Spencer E, Bull D (2007). Cancer incidence and mortality in relation to body mass index in the Million Women Study: cohort study. *BMJ* **335**: 1134.
- Reis-Filho JS, Savage K, Lambros MB, James M, Steele D, Jones RL *et al* (2006). Cyclin D1 protein overexpression and CCND1 amplification in breast carcinomas: an immunohistochemical and chromogenic in situ hybridisation analysis. *Mod Pathol* **19**: 999-1009.
- Ren S, Xu C, Cui Z, Yu Y, Xu W, Wang F *et al* (2012). Oncogenic CUL4A determines the response to thalidomide treatment in prostate cancer. *J Mol Med (Berl)* **90**: 1121-32.
- Renwick A, Thompson D, Seal S, Kelly P, Chagtai T, Ahmed M *et al* (2006). ATM mutations that cause ataxia-telangiectasia are breast cancer susceptibility alleles. *Nat Genet* **38**: 873-5.
- Resnick MB, Gavilanez M, Newton E, Konkin T, Bhattacharya B, Britt DE *et al* (2005). Claudin expression in gastric adenocarcinomas: a tissue microarray study with prognostic correlation. *Hum Pathol* **36**: 886-92.

Roy PG, Pratt N, Purdie CA, Baker L, Ashfield A, Quinlan P *et al* (2010). High CCND1 amplification identifies a group of poor prognosis women with estrogen receptor positive breast cancer. *Int J Cancer* **127**: 355-60.

Salgado R, Toll A, Alameda F, Baro T, Martin-Ezquerro G, Sanmartin O *et al* (2010). CKS1B amplification is a frequent event in cutaneous squamous cell carcinoma with aggressive clinical behaviour. *Genes Chromosomes Cancer* **49**: 1054-61.

Sarikas A, Hartmann T, Pan ZQ (2011). The cullin protein family. *Genome Biol* **12**: 220.

Sato M, Bremner I (1993). Oxygen free radicals and metallothionein. *Free Radic Biol Med* **14**: 325-37.

Schena M, Shalon D, Davis RW, Brown PO (1995). Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science* **270**: 467-70.

Schindl M, Gnant M, Schoppmann SF, Horvat R, Birner P (2007). Overexpression of the human homologue for *Caenorhabditis elegans* cul-4 gene is associated with poor outcome in node-negative breast cancer. *Anticancer Res* **27**: 949-52.

Schneider BP, Winer EP, Foulkes WD, Garber J, Perou CM, Richardson A *et al* (2008). Triple-negative breast cancer: risk factors to potential targets. *Clin Cancer Res* **14**: 8010-8.

Schraml P, Schwerdtfeger G, Burkhalter F, Raggi A, Schmidt D, Ruffalo T *et al* (2003). Combined array comparative genomic hybridization and tissue microarray analysis suggest PAK1 at 11q13.5-q14 as a critical oncogene target in ovarian carcinoma. *Am J Pathol* **163**: 985-92.

Seal S, Thompson D, Renwick A, Elliott A, Kelly P, Barfoot R *et al* (2006). Truncating mutations in the Fanconi anemia J gene BRIP1 are low-penetrance breast cancer susceptibility alleles. *Nat Genet* **38**: 1239-41.

Shan B, Farmer AA, Lee WH (1996). The molecular basis of E2F-1/DP-1-induced S-phase entry and apoptosis. *Cell Growth Differ* **7**: 689-97.

Shibuya K, Nishimura N, Suzuki JS, Tohyama C, Naganuma A, Satoh M (2008). Role of metallothionein as a protective factor against radiation carcinogenesis. *J Toxicol Sci* **33**: 651-5.

Shimoda R, Achanzar WE, Qu W, Nagamine T, Takagi H, Mori M *et al* (2003). Metallothionein is a potential negative regulator of apoptosis. *Toxicol Sci* **73**: 294-300.

Shinomiya T, Mori T, Ariyama Y, Sakabe T, Fukuda Y, Murakami Y *et al* (1999). Comparative genomic hybridization of squamous cell carcinoma of the esophagus: the possible involvement of the DPI gene in the 13q34 amplicon. *Genes Chromosomes Cancer* **24**: 337-44.

Sircoulomb F, Nicolas N, Ferrari A, Finetti P, Bekhouche I, Rousselet E *et al* (2011). ZNF703 gene amplification at 8p12 specifies luminal B breast cancer. *EMBO Mol Med* **3**: 153-66.

Slamon DJ, Clark GM, Wong SG, Levin WJ, Ullrich A, McGuire WL (1987). Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science* **235**: 177-82.

- Smalley KS, Brafford P, Haass NK, Brandner JM, Brown E, Herlyn M (2005). Up-regulated expression of zonula occludens protein-1 in human melanoma associates with N-cadherin and contributes to invasion and adhesion. *Am J Pathol* **166**: 1541-54.
- Sorlie T, Perou CM, Tibshirani R, Aas T, Geisler S, Johnsen H *et al* (2001). Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: 10869-74.
- Sorlie T, Tibshirani R, Parker J, Hastie T, Marron JS, Nobel A *et al* (2003). Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**: 8418-23.
- Stefansson OA, Jonasson JG, Johannsson OT, Olafsdottir K, Steinarsdottir M, Valgeirsdottir S *et al* (2009). Genomic profiling of breast tumours in relation to BRCA abnormalities and phenotypes. *Breast Cancer Res* **11**: R47.
- Stephens PJ, McBride DJ, Lin ML, Varela I, Pleasance ED, Simpson JT *et al* (2009). Complex landscapes of somatic rearrangement in human breast cancer genomes. *Nature* **462**: 1005-10.
- Stephens PJ, Tarpey PS, Davies H, Van Loo P, Greenman C, Wedge DC *et al* (2012). The landscape of cancer genes and mutational processes in breast cancer. *Nature* **486**: 400-4.
- Storchova Z, Pellman D (2004). From polyploidy to aneuploidy, genome instability and cancer. *Nat Rev Mol Cell Biol* **5**: 45-54.
- Sugasawa K (2006). UV-induced ubiquitylation of XPC complex, the UV-DDB-ubiquitin ligase complex, and DNA repair. *J Mol Histol* **37**: 189-202.
- Sugasawa K, Okuda Y, Saijo M, Nishi R, Matsuda N, Chu G *et al* (2005). UV-induced ubiquitylation of XPC protein mediated by UV-DDB-ubiquitin ligase complex. *Cell* **121**: 387-400.
- Sun H, Taneja R (2007). Analysis of transformation and tumorigenicity using mouse embryonic fibroblast cells. *Methods Mol Biol* **383**: 303-10.
- Tai SK, Tan OJ, Chow VT, Jin R, Jones JL, Tan PH *et al* (2003). Differential expression of metallothionein 1 and 2 isoforms in breast cancer lines with different invasive potential: identification of a novel nonsilent metallothionein-1H mutant variant. *Am J Pathol* **163**: 2009-19.
- Torti D, Trusolino L (2011). Oncogene addiction as a foundational rationale for targeted anti-cancer therapy: promises and perils. *EMBO Mol Med* **3**: 623-36.
- Turner N, Lambros MB, Horlings HM, Pearson A, Sharpe R, Natrajan R *et al* (2010a). Integrative molecular profiling of triple negative breast cancers identifies amplicon drivers and potential therapeutic targets. *Oncogene* **29**: 2013-23.
- Turner N, Pearson A, Sharpe R, Lambros M, Geyer F, Lopez-Garcia MA *et al* (2010b). FGFR1 amplification drives endocrine therapy resistance and is a therapeutic target in breast cancer. *Cancer Res* **70**: 2085-94.

- Urruticoechea A, Smith IE, Dowsett M (2005). Proliferation marker Ki-67 in early breast cancer. *J Clin Oncol* **23**: 7212-20.
- Vargo-Gogola T, Rosen JM (2007). Modelling breast cancer: one size does not fit all. *Nat Rev Cancer* **7**: 659-72.
- Visvader JE (2009). Keeping abreast of the mammary epithelial hierarchy and breast tumorigenesis. *Genes Dev* **23**: 2563-77.
- Wang H, Zhai L, Xu J, Joo HY, Jackson S, Erdjument-Bromage H *et al* (2006). Histone H3 and H4 ubiquitylation by the CUL4-DDB-ROC1 ubiquitin ligase facilitates cellular response to DNA damage. *Mol Cell* **22**: 383-94.
- Ward MC, van der Watt PJ, Tzoneva G, Leaner VD (2011). Deregulated LAP2alpha expression in cervical cancer associates with aberrant E2F and p53 activities. *IUBMB Life* **63**: 1018-26.
- Watson CJ, Khaled WT (2008). Mammary development in the embryo and adult: a journey of morphogenesis and commitment. *Development* **135**: 995-1003.
- Weinstein IB (2002). Cancer. Addiction to oncogenes--the Achilles heel of cancer. *Science* **297**: 63-4.
- Weinstein IB, Joe A (2008). Oncogene addiction. *Cancer Res* **68**: 3077-80; discussion 3080.
- Weinstein IB, Joe AK (2006). Mechanisms of disease: Oncogene addiction--a rationale for molecular targeting in cancer therapy. *Nat Clin Pract Oncol* **3**: 448-57.
- Wilkerson PM, Reis-Filho JS (2012). The 11q13-q14 amplicon: clinicopathological correlations and potential drivers. *Genes Chromosomes Cancer* **52**: 333-55.
- Wooster R, Bignell G, Lancaster J, Swift S, Seal S, Mangion J *et al* (1995). Identification of the breast cancer susceptibility gene BRCA2. *Nature* **378**: 789-92.
- Wu CL, Zukerberg LR, Ngwu C, Harlow E, Lees JA (1995). In vivo association of E2F and DP family proteins. *Mol Cell Biol* **15**: 2536-46.
- Yasui K, Arai S, Zhao C, Imoto I, Ueda M, Nagai H *et al* (2002). TFDP1, CUL4A, and CDC16 identified as targets for amplification at 13q34 in hepatocellular carcinomas. *Hepatology* **35**: 1476-84.
- Yehiely F, Moyano JV, Evans JR, Nielsen TO, Cryns VL (2006). Deconstructing the molecular portrait of basal-like breast cancer. *Trends Mol Med* **12**: 537-44.